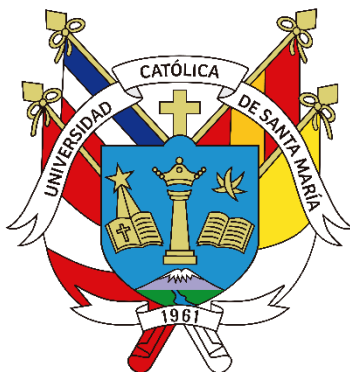


Universidad Católica de Santa María

Facultad de Ciencias Farmacéuticas, Bioquímicas y Biotecnológicas

Escuela Profesional de Ingeniería Biotecnológica



**Desarrollo del Down Stream Óptimo para la Extracción y Purificación de
Astaxantina, Obtenida de Cepa *Haematococcus sp.* con un Solvente Eco
Amigable para su uso en Industria Médica, Nutracéutica, Dermo y Bio
Cosmética**

Tesis presentada por la Bachiller:

Cruces Cáceres, Elionora Edith

ORCID: 0009-0009-3766-8227

para optar el Título Profesional de:

Ingeniera Biotecnóloga

Asesora:

M. Sc. López Álvarez, Natalia Paola

ORCID: 0000-0001-8501-4951

Arequipa - Perú

2024

UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA

INGENIERIA BIOTECNOLOGICA

TITULACIÓN CON TESIS

DICTAMEN APROBACIÓN DE BORRADOR

Arequipa, 01 de Mayo del 2024

Dictamen: 007910-C-EPIB-2024

Visto el borrador del expediente 007910, presentado por:

2017242942 - CRUCES CACERES ELIONORA EDITH

Titulado:

**DESARROLLO DEL DOWN STREAM ÓPTIMO PARA LA EXTRACCIÓN Y PURIFICACIÓN DE
ASTAXANTINA, OBTENIDA DE CEPA HAEMATOCOCCUS SP. CON UN SOLVENTE ECO AMIGABLE
PARA SU USO EN INDUSTRIA MÉDICA, NUTRACÉUTICA, DERMO Y BIO COSMÉTICA**

Nuestro dictamen es:

APROBADO

Título Profesional/Título de Segunda Especialidad/Grado Académico a optar:

INGENIERO BIOTECNOLOGO

**42098888 - CORDOVA BARRIOS CINTHIA CAROL
DICTAMINADOR**



**43668681 - PAREDES FUENTES JULITZA LINDSEY
DICTAMINADOR**



**45498291 - ALVARADO QUIROZ KENY DAVI
DICTAMINADOR**



Desarrollo del Down Stream Óptimo para la Extracción y Purificación de Astaxantina, Obtenida de Cepa Haematococcus sp. con un Solvente Eco Amigable para su uso en Industria Médica, Nutracéutica, Dermo

INFORME DE ORIGINALIDAD

14%

INDICE DE SIMILITUD

13%

FUENTES DE INTERNET

10%

PUBLICACIONES

8%

TRABAJOS DEL ESTUDIANTE

ENCONTRAR COINCIDENCIAS CON TODAS LAS FUENTES (SOLO SE IMPRIMIRÁ LA FUENTE SELECCIONADA)

1%

★ Yanlong Gu, Michelle Yee Mun Teo, Lionel Lian Aun In, Kazuya Shimizu, Kyu-Jung Chae, Tran Thi Ngoc Thu, Kuan Shiong Khoo. "Genetic engineering of Haematococcus pluvialis microalgae for the enhancement of astaxanthin production: a review", Biocatalysis and Agricultural Biotechnology, 2024

Publicación

Excluir citas

Apagado

Excluir coincidencias

Apagado

Excluir bibliografía

Apagado



*A mis padres y
a Fax.*

AGADECIMIENTOS

A mi padre por apoyarme incondicionalmente en todo lo que hago.

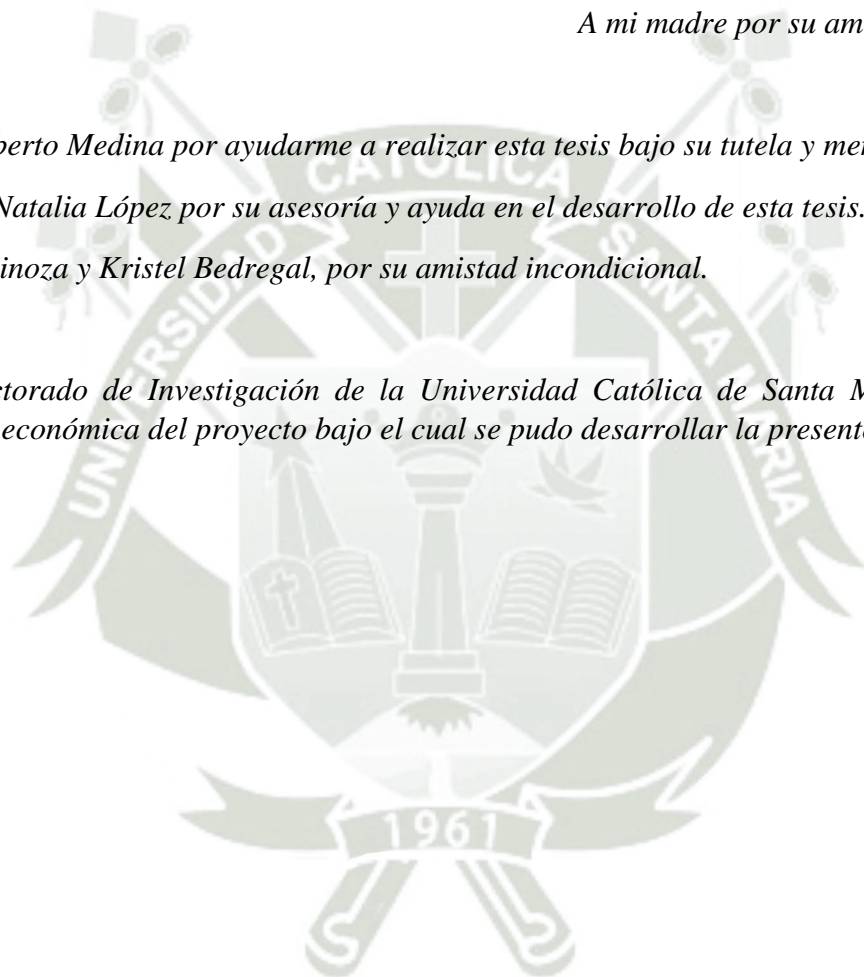
A mi madre por su amor y consejo.

Al Dr. Edilberto Medina por ayudarme a realizar esta tesis bajo su tutela y mentoría.

A la M. Sc Natalia López por su asesoría y ayuda en el desarrollo de esta tesis.

A Sofía Espinoza y Kristel Bedregal, por su amistad incondicional.

Al Vicerrectorado de Investigación de la Universidad Católica de Santa María por la subvención económica del proyecto bajo el cual se pudo desarrollar la presente tesis.

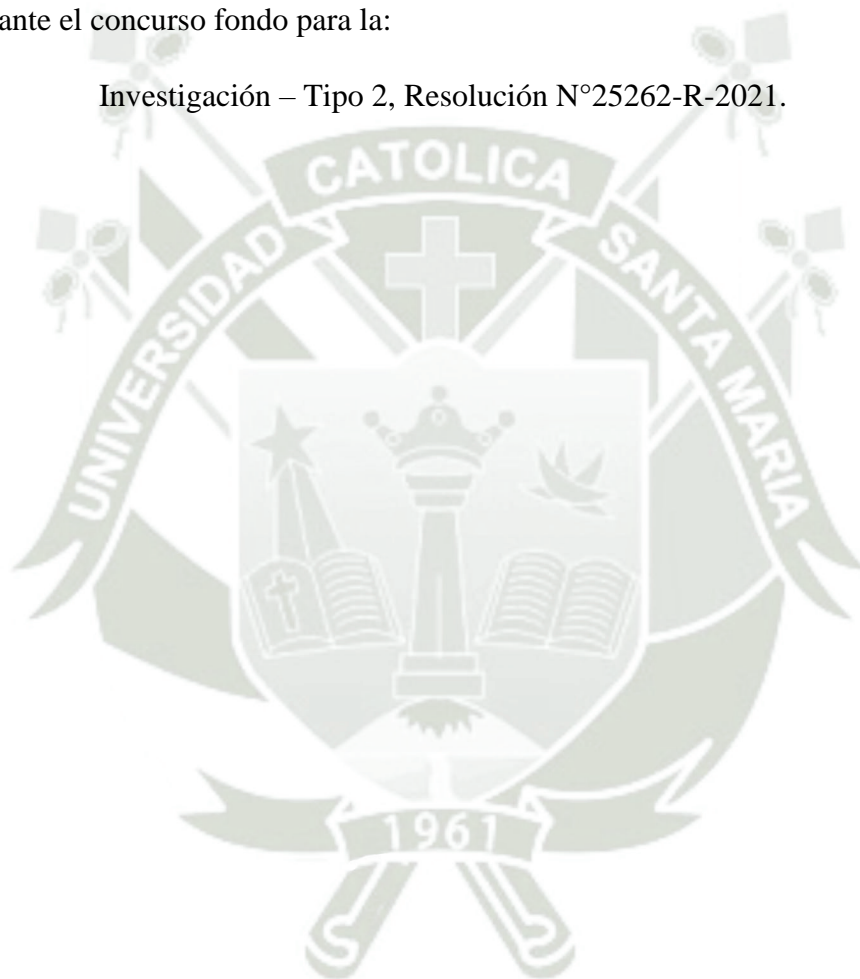


Esta tesis es parte del proyecto de investigación:

“DESARROLLO, FORMULACIÓN Y VALIDACIÓN DERMATOLÓGICA DE UN SERUM FACIAL CON ACTIVIDAD RESTAURADORA DE LA BARRERA CUTÁNEA DE LA PIEL REAFIRMANTE Y HUMECTANTE A BASE DE EXTRACTO DE ASTAXANTINA PURIFICADA COMO PRINCIPIO ACTIVO”

Financiada a través del Vicerrectorado de Investigación de la Universidad Católica de Santa María mediante el concurso fondo para la:

Investigación – Tipo 2, Resolución N°25262-R-2021.



RESUMEN

Astaxantina es un pigmento carotenoides de interés ya que presenta una alta actividad antioxidante que permite la eliminación de radicales libres, causantes del envejecimiento e incrementan la posibilidad de cáncer y enfermedades degenerativas, dicha actividad es superior a la actividad de otros antioxidantes. La metodología utilizada en esta investigación incluye la selección de cepas de *Haematococcus sp.* utilizando; centrifugación, medio restringido y diluciones seriadas, también incluye la optimización de la carotenogénesis, en otras palabras “estresar” la cepa para desencadenar la producción de astaxantina, para esto se evaluaron los 8 factores inductores más usados y se determinaron que las condiciones óptimas son: ausencia de nitrógeno, aumentar 5 g/L de cloruro de sodio al medio, disminuir los compuestos de fósforo de 25 g a 5 g/L, aumentar el tiempo de luz a 18 horas al día y una temperatura constante de 37 °C.

Además, se determinó la extracción con etanol al 96% es superior en diluir los pigmentos de la cepa obteniendo un promedio de cuantificación de 12.818 mg/L de carotenoides totales, se delimitó que los factores acompañantes para una extracción ideal son elevar la temperatura a 35 °C por un tiempo de 35 minutos.

Finalmente se logró la purificación del metabolito, haciendo uso de una cromatografía preparativa con una fase móvil de acetona y hexano a una concentración de 1:3 y 0.36 respectivamente, el raspado de placa y extracción con etanol dejó un recolectado de 0.44 g de astaxantina pura, así mismo se realizó la evaluación de la astaxantina obtenida, con un barrido espectral de UV- visible que dio un pico en la región de 476 nm región específica de astaxantina y una resonancia magnética nuclear cuya corrida tuvo el desplazamiento químico de 0 a 8 ppm y señales características de la astaxantina.

Palabras clave: Astaxantina, *Haematococcus sp.*, extracción, purificación de metabolito.

ABSTRACT

Astaxanthin is a carotenoid pigment of interest due to its high antioxidant activity, which allows for the elimination of free radicals, known to contribute to aging and increase the risk of cancer and degenerative diseases. This activity is superior to that of other antioxidants. The methodology used in this research includes the selection of *Haematococcus sp.* using, centrifugation, restricted media, and serial dilution methods. It also includes the optimization of carotene genesis, in other words, "stressing" the strain to trigger astaxanthin production. The eight most used inducing factors were evaluated, and the optimal conditions were determined to be: absence of nitrogen, increasing the sodium chloride concentration in the media by 5 g/L, decreasing the phosphorus compounds from 25 g to 5 g/L, increasing the light exposure to 18 hours per day, and maintaining a constant temperature of 37 °C.

Furthermore, it was determined that extraction with 96% ethanol is superior in diluting the pigments of the strain, resulting in an average quantification of 12.818 mg/L of total carotenoids. It was delimited that the accompanying factors for an ideal extraction include raising the temperature to 35 °C for a duration of 35 minutes.

Finally, the purification of the metabolite was achieved using preparative chromatography with a mobile phase of acetone and hexane at a concentration of 1:3 and 0.36, respectively. Plate scraping and ethanol extraction yielded a collected amount of 0.44 g of pure astaxanthin. The obtained astaxanthin was also evaluated using UV-visible spectral scanning, which showed a peak in the specific region of 476 nm for astaxanthin, and nuclear magnetic resonance spectroscopy, which exhibited chemical shifts ranging from 0 to 8ppm and characteristic signals of astaxanthin.

Key words: Astaxanthin, *Haematococcus sp.*, extraction, metabolite purification.

ÍNDICE

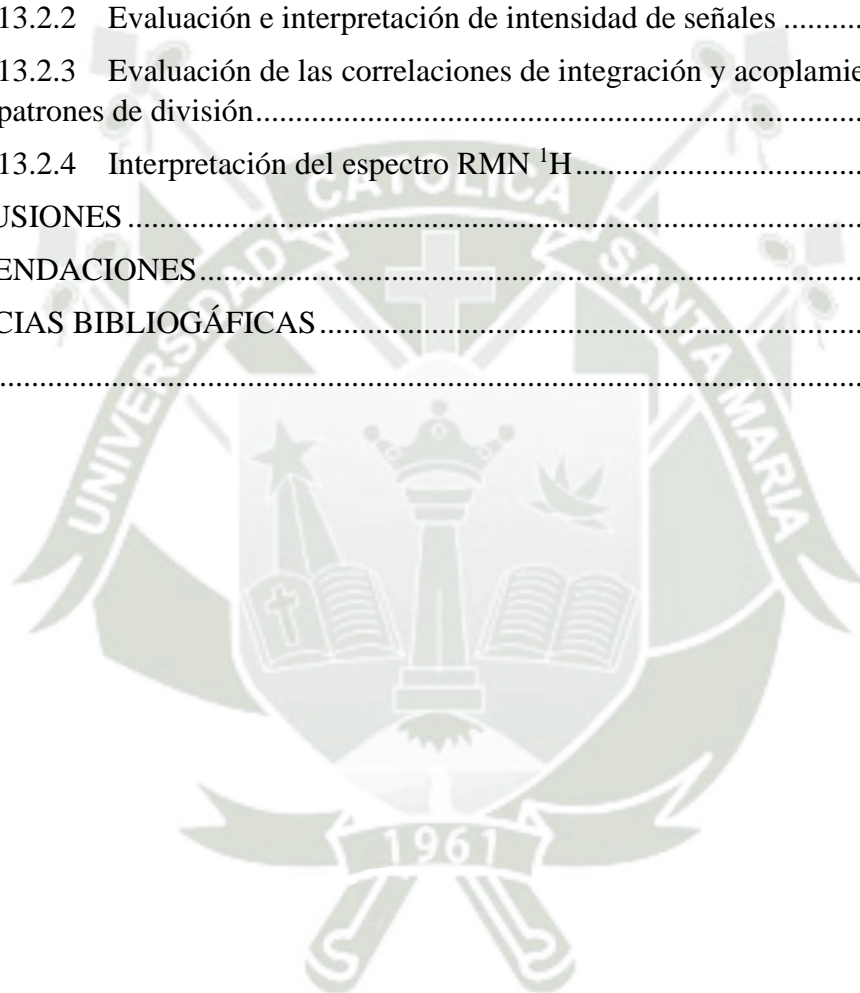
RESUMEN	6
ABSTRACT	7
LISTADO DE ABREVIATURAS	13
LISTA DE ECUACIONES	14
LISTA DE FIGURAS	15
LISTA DE TABLAS	18
INTRODUCCIÓN	20
OBJETIVOS	22
HIPÓTESIS	23
VARIABLES	24
CAPÍTULO I	25
MARCO TEÓRICO	25
1. ASTAXANTINA	25
1.1 Estructura y características químicas de la astaxantina	25
1.2 Bioquímica de la astaxantina	26
1.3 Actividad biológica y sus aplicaciones	28
1.3.1 Aplicación en la industria nutracéutica	29
1.3.2 Aplicación en la industria demo cosmética	29
I. Efecto fotoprotector de la piel	30
II. Efecto hidratante y antienvjecimiento en la piel	31
III. Efecto cicatrizante	31
IV. Efecto curativo en dermatitis	32
1.3.3 Aplicación en la industria médica	32
V. Actividad hepatoprotectora	33
VI. Actividad cardioprotectora	33
VII. Actividad en protección ocular	34
VIII. Actividad antidiabética	34
IX. Actividad antiobesidad	34
X. Actividad anticancerígena	35
XI. Actividad antiinflamatoria	35

1.4	Fuentes de astaxantina	36
1.4.1	Fuentes sintéticas	38
1.4.2	Fuentes naturales	38
2.	<i>HAEMATOCOCCUS SP.</i>	39
2.1	Distribución y aspectos fisiológicos	39
2.2	Clasificación taxonómica y composición	39
2.3	Ciclo de vida y cambios fisiológicos	40
2.4	Biosíntesis de astaxantina en <i>Haematococcus sp.</i>	41
2.4.1	Principios biológicos y tecnología para cultivo de <i>Haematococcus sp.</i>	41
2.4.2	Crecimiento y cosecha de biomasa.....	43
2.4.3	Carotenogénesis, activación de la biosíntesis de astaxantina	43
2.4.4	Extracción de astaxantina a partir de <i>Haematococcus sp.</i>	45
	I. Disrupción mecánica	45
	II. Extracción química	46
3.	MÉTODOS DE PURIFICACIÓN E IDENTIFICACIÓN	46
3.1	Cromatografía en capa fina o TLC	47
3.1.1	Cromatografía en capa fina bidimensional o TLC 2D	48
3.2	Cromatografía preparativa - C Prep	48
3.3	Barrido espectral de UV-Visible	48
3.4	Resonancia magnética nuclear - NMR	49
4.	PRUEBAS ESTADÍSTICAS	49
4.1	Plackett–Burman design	49
4.2	Método Taguchi.....	50
4.3	Response surface methodology - RSM	50
CAPÍTULO II.....		51
MATERIALES Y MÉTODOS		51
5.	LOCALIZACIÓN Y MATERIAL DE EXPERIMENTACIÓN.....	51
5.1	Lugar de ejecución.....	51
5.2	Material.....	51
5.2.1	Material biológico	51
5.2.2	Material de vidrio y plástico	51
5.2.3	Reactivos	52

5.2.4	Instrumentos y aparatos	53
5.2.5	Equipos	53
6.	METODOLOGÍA EXPERIMENTAL	54
6.1	Selección y recepción de la cepa	54
6.2	Eliminación de contaminantes microbianos de <i>Haematococcus sp.</i>	54
6.2.1	Método de aislamiento por centrifugación	54
6.2.2	Método de aislamiento en placa con medio restringido	54
6.2.3	Método de aislamiento por diluciones seriadas	56
6.3	Producción de biomasa de <i>Haematococcus sp.</i>	57
6.3.1	Condiciones ambientales y selección del medio de cultivo	57
6.3.2	Escalamiento para acumulación de biomasa	58
6.4	Inducción de la cepa <i>Haematococcus sp.</i> para la producción de astaxantina 58	
6.4.1	Selección y optimización de inductores químicos.....	59
6.4.2	Selección y optimización de inductores físicos.....	59
6.4.3	Inducción de la biomasa para desencadenar la carotenogénesis	60
6.5	Extracción y cuantificación de carotenoides totales.....	61
6.5.1	Tratamiento para la extracción de carotenoides de la biomasa	61
6.5.2	Cuantificación espectrofotométrica de pigmentos	62
6.6	Selección del mejor método de extracción de astaxantina	64
6.6.1	Preparación de la muestra.....	64
6.6.2	Evaluación de extracción con solventes	64
6.6.3	Evaluación de las variables que asisten a la extracción con solventes.....	65
6.7	Separación e identificación de astaxantina	66
6.7.1	Evaluación de solventes para la fase móvil de cromatografía en capa fina del extracto de <i>Haematococcus sp.</i>	66
6.7.2	Selección de la fase móvil idónea para la separación de pigmentos	67
6.7.3	Evaluación de mezcla de solventes para obtener una fase móvil ideal con cromatografía en capa fina bidimensional	68
6.7.4	Selección de los porcentajes de solventes para la fase móvil idónea	69
6.8	Purificación de astaxantina del extracto de <i>Haematococcus sp.</i>	69
6.8.1	Separación de los pigmentos en el extracto crudo con cromatografía preparativa - CPrep	69

6.8.2	Extracción y purificación de astaxantina del ensayo CPrep.....	71
6.9	Evaluación de astaxantina purificada	72
6.9.1	Identificación por barrido espectral de UV-Visible	72
6.9.2	Resonancia magnética nuclear RMN	72
I.	Preparación y corrida de muestra en resonancia magnética nuclear	72
II.	Evaluación y análisis del espectro RMN con Mnova 1D NMR.....	74
CAPÍTULO III		75
RESULTADOS Y DISCUSIÓN		75
7.	AISLAMIENTO DE HAEMATOCOCCUS SP.	75
7.1	Método de aislamiento por centrifugación	75
7.2	Método de aislamiento en placa con medio restringido	76
7.3	Método de aislamiento por diluciones seriadas.....	77
8.	PRODUCCIÓN DE BIOMASA.....	77
8.1	Selección de condiciones ambientales y del medio de cultivo.....	77
8.2	Escalamiento para acumulación de biomasa	78
9.	IDENTIFICACIÓN DE PARÁMETROS Y COMPUESTOS PARA DESENCADENAR LA CAROTENOGÉNESIS EN <i>HAEMATOCOCCUS SP.</i>	79
10.	EXTRACCIÓN DE CAROTENOIDES TOTALES	80
10.1	Tratamiento para la extracción de carotenoides de la biomasa	80
10.2	Cuantificación espectrofotométrica de pigmentos	81
10.2.1	Optimización de los compuestos químicos para inducir la carotenogenesis	83
10.2.2	Optimización de las variables físicas para inducir la carotenogenesis .	87
10.3	Selección del mejor método de extracción de astaxantina	89
10.3.1	Preparación de la muestra.....	89
10.3.2	Evaluación de extracción con solventes	90
10.3.3	Evaluación de las variables que asisten a la extracción con solventes .	91
11.	PURIFICACIÓN E IDENTIFICACIÓN DE ASTAXANTINA	94
11.1	Evaluación de la fase móvil idónea para la separación de pigmentos.....	94
11.2	Evaluación de la pureza de la astaxantina con cromatografía en capa fina bidimensional	96
11.3	Selección de porcentajes de solventes para la fase móvil idónea.....	97
12.	PURIFICACIÓN DE ASTAXANTINA.....	99

12.1	Separación de los pigmentos en el extracto crudo con cromatografía preparativa - CPrep.....	99
12.2	Extracción y purificación de astaxantina del ensayo CPrep.....	100
13.	EVALUACIÓN DE LA PUREZA DE LA ASTAXANTINA	101
13.1	Identificación por barrido espectral de UV-Visible	101
13.2	Resonancia magnética nuclear RMN	103
13.2.1	Análisis del desplazamiento químico	103
13.2.2	Evaluación e interpretación de intensidad de señales	104
13.2.3	Evaluación de las correlaciones de integración y acoplamiento o patrones de división.....	106
13.2.4	Interpretación del espectro RMN ¹ H.....	107
	CONCLUSIONES	111
	RECOMENDACIONES.....	113
	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	115
	ANEXOS	126



LISTADO DE ABREVIATURAS

AX - Astaxantina

ROS - Especies Reactivas de Oxígeno

BBM - Bold's Basal Medium

UV Spectra - Espectro de UV-visible

NMR ¹H - Resonancia Magnética Nuclear de protón

TLC - Cromatografía en Capa Fina

CPrep - Cromatografía Preparativa

PB - Plackett–Burman design

RSM – Metodología de Superficie de Respuesta

CA - Clorofila A

CB - Clorofila B

TC - Carotenoides Totales

pH - Indicador de potencial de Hidrogeno

ppm - partes por millón

nm – nanómetros

rpm - Revoluciones por minuto

µm - Micrómetro

LISTA DE ECUACIONES

Ecuación 1. Ecuación de clorofila a de Lichtenthaler and Wellburn.

Ecuación 2. Ecuación de clorofila b de L & W.

Ecuación 3. Ecuación de carotenoides totales de L & W.

Ecuación 4. Ecuación de clorofila a de L & W para metanol.

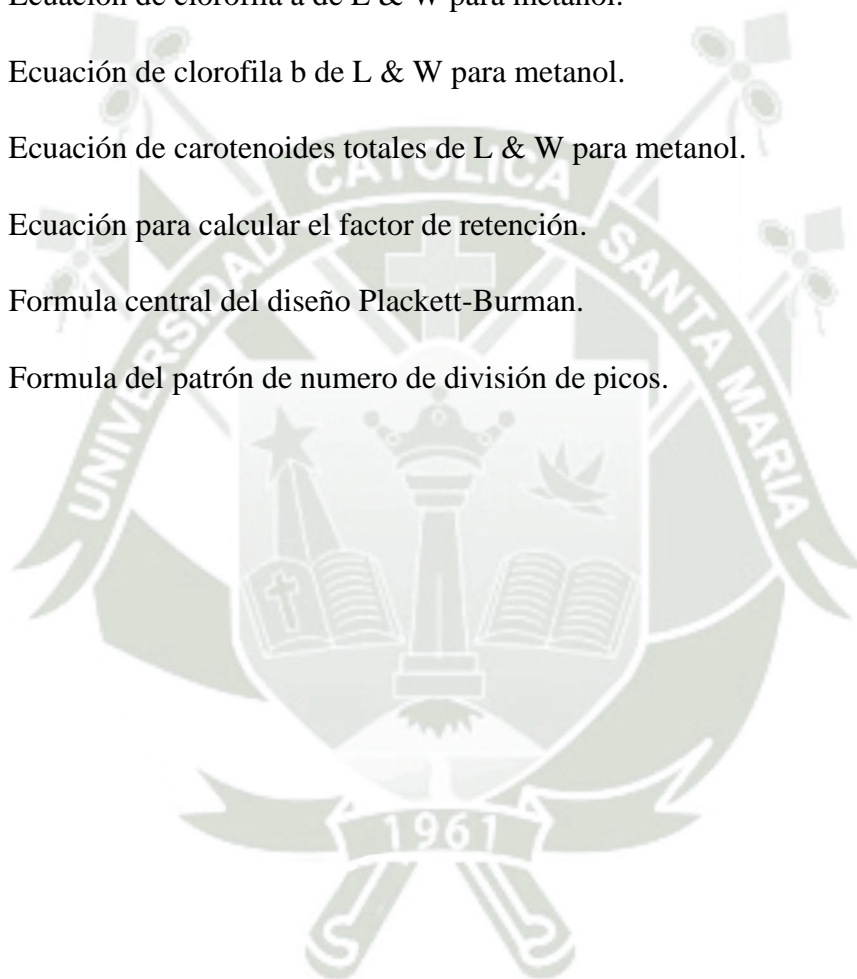
Ecuación 5. Ecuación de clorofila b de L & W para metanol.

Ecuación 6. Ecuación de carotenoides totales de L & W para metanol.

Ecuación 7. Ecuación para calcular el factor de retención.

Ecuación 8. Formula central del diseño Plackett-Burman.

Ecuación 9. Formula del patrón de numero de división de picos.



LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. Estructuras químicas del licopeno y astaxantina.
- Figura 2. Comparación de la posición de antioxidantes en la membrana celular.
- Figura 3. Mapa resumen de los múltiples beneficios de la astaxantina a la salud.
- Figura 4. Potencia de eliminación de % radicales libres por mg de diferentes antioxidantes.
- Figura 5. Ciclo de la cepa *Haematococcus sp.*.
- Figura 6. Factores en la activación de Carotenogénesis en *Haematococcus sp.*.
- Figura 7. Método de aislamiento en placa con medio restringido.
- Figura 8. Método de aislamiento por diluciones seriadas.
- Figura 9. Inducción de la cepa *Haematococcus sp.* para la producción de astaxantina.
- Figura 10. Tratamiento para la extracción de carotenoides de la biomasa de *Haematococcus sp.*.
- Figura 11. Pasos para una evaluación de cromatografía en capa fina.
- Figura 12. Pasos para una evaluación de cromatografía en capa fina bidimensional.
- Figura 13. Metodología para una cromatografía preparativa.
- Figura 14. Lectura de muestra en un equipo de resonancia magnética nuclear.
- Figura 15. (A) Primera evaluación antes del método de centrifugación, (B) Segunda evaluación microscópica después del método de centrifugación.
- Figura 16. (A) Resultados de la primera purificación en placa, aun se observa muchas células *Scenedesmus sp.* (B) Resultados de la segunda purificación en placa, ya no se ven células contaminantes alrededor, pero aún persisten en medio de las células de *Haematococcus sp.*
- Figura 17. (A) Diluciones seriadas. (B) Resultados de la técnica de aislamiento por diluciones seriadas.
- Figura 18. Antes y después del escalamiento de biomasa de *Haematococcus sp.*.

Figura 19. (A) Biomasa a los seis días (B) Biomasa a los doce días.

Figura 20. Tratamiento de interrupción, minuto 1, 5 y 10.

Figura 21. (A) Extracción de los pigmentos de la biomasa con solvente (B) Recuperación de los pigmentos en el solvente.

Figura 22. Esquematación gráfica de la importancia de las variables.

Figura 23. Gráfica de superficies de nitrógeno en relación con fósforo.

Figura 24. Gráfica de superficies de nitrógeno en relación con cloruro de sodio.

Figura 25. Gráfica de superficies de fósforo en relación con cloruro de sodio.

Figura 26. Gráfico de efectos principales en función al tiempo y temperatura.

Figura 27. (A) Germinación (B) Resultados del secado de *Haematococcus sp.*

Figura 28. Trial por triplicado de extracción con solventes, acetona, hexano, etanol y cloroformo.

Figura 29. Gráfica de superficies de concentración en relación con temperatura.

Figura 30. Gráfica de superficies de tiempo en relación con temperatura.

Figura 31. Gráfica de superficies de tiempo en relación con concentración.

Figura 32. Cromatografías en capa fina con diferentes fases móviles: cloroformo, hexano, acetona y benceno, de izquierda a derecha.

Figura 33. Cromatografías bidimensionales en capa fina con acetona + cloroformo y acetona + hexano.

Figura 34. Separación de pigmentos con mezclas 1:4 v/v a 1:3 v/v de acetona y hexano.

Figura 35. Purificación de pigmentos de la fase estacionaria con etanol.

Figura 36. TLC de astaxantina y astaxantina purificada.

Figura 37. Curva de transmitancia espectral de astaxantina pura.

Figura 38. UV-Vis scanning curve of astaxanthin dissolved in ethanol.

Figura 39. Espectro RMN de astaxantina pura obtenida de *Haematococcus sp.*

Figura 40. NMR analysis of astaxanthin extract by MET-ACE method.

Figura 41. Estimación de la molécula de astaxantina en ChemNMR 1H.

Figura 42. Estimación superpuesta al espectro de astaxantina NMR 1H.

Figura 43. Espectro de astaxantina del estudio de Sun. W et al.

Figura 44. Espectro RMN 1H de astaxantina pura.

Figura 45. Interpretación del espectro NMR 1H de la molécula de astaxantina.

Figura 46. Barrido espectral para evaluación de carotenoides.

Figura 47. Estimación de la molécula de astaxantina en ChemNMR 1H.



LISTA DE TABLAS

- Tabla 1. Data resumida de la investigación clínica humana con astaxantina.
- Tabla 2. Inhibición de % radicales libres por mg de diferentes antioxidantes.
- Tabla 3. Coeficientes de absorción específicos y longitudes de onda de diferentes solventes.
- Tabla 4. Variables y niveles para la inducción de la carotenogénesis.
- Tabla 5. Rango de las variables más importantes y sus efectos.
- Tabla 6. Coeficientes de retención de cromatografías en capa fina.
- Tabla 7. Coeficientes de retención de TLC bidimensional con diferentes mezclas.
- Tabla 8. Bold's Basal Medium (BBM) formula modificada.
- Tabla 9. Variables físicas y químicas para inducción de astaxantina.
- Tabla 10. Componentes de medio BBM para 200mL de cada experimento.
- Tabla 11. Variables para usar en medio Basal bold por orden de corrida.
- Tabla 12. Desplazamientos Químicos en RMN ^1H en diferentes tipos de compuestos orgánicos.
- Tabla 13. Desplazamientos químicos de alcanos mono-sustituídos.
- Tabla 14. Desplazamientos químicos de ^1H y constantes de acoplamiento de derivados acetílicos.
- Tabla 15. Desplazamientos de protones unidos a carbonos sp^2 .
- Tabla 16. Estimación del desplazamiento de protones unidos a doble enlace.
- Tabla 17. Estimación del desplazamiento de grupos $-\text{CH}_3$, $-\text{CH}_2$ y CH .
- Tabla 18. Evaluación de diferentes variables mediante cuantificación de carotenoides.
- Tabla 19. Evaluación de inducción de variables químicas por RSM.
- Tabla 20. Evaluación de corroboración de variables químicas.

Tabla 21. Evaluación de inductores físicos con método Taguchi.

Tabla 22. Evaluación de corroboración de variables de tiempo.

Tabla 23. Evaluación de factores que afectan la extracción de astaxantina

Tabla 24. Tabla de estimación de desplazamiento y acoplamiento químico de astaxantina.



INTRODUCCIÓN

Las microalgas son microorganismos fotosintéticos, que se pueden encontrar en diversos entornos acuosos, muestras de suelo e incluso hielo (1). A pesar de las similitudes en los mecanismos fotosintéticos con las plantas terrestres, las microalgas convierten la energía solar en biomasa de manera más eficiente que las plantas terrestres debido a su estructura celular más simple y acceso más fácil a los nutrientes básicos en ambientes acuáticos (1).

El gran interés en las microalgas está relacionado en su uso para la producción de biocombustibles, nutraceúticos, colorantes, biopolímeros, además de ser responsables de sintetizar una amplia gama de sustancias de alto valor comercial que se pueden utilizar en productos farmacéuticos, cosméticos y alimenticios (2).

Una de estas sustancias es la astaxantina, un carotenoide con capacidad antioxidante, 1000 veces mayor al de la vitamina E, 200 veces al de los polifenoles del té verde, 100 veces al de α -tocoferol, 65 veces al de la vitamina C y es generalmente 10 veces mayor que otros carotenoides, como β -caroteno y luteína, es el antioxidante más poderoso encontrado en la naturaleza hasta la fecha (3)

La astaxantina tiene propiedades favorables, como antioxidante, antitumoral, antienvjecimiento, antiinflamatoria, antihipertensiva, anticancerígena nutracéutica y fotoprotectora, lo que permite ampliar su uso en diversas industrias (2,4). Se ha reportado que el mercado para astaxantina es de hasta 447 millones de dólares, con un precio en el mercado de 2,000 - 7,000 \$/kg (4). Sin embargo, gran parte de la astaxantina se produce por medio de síntesis química lo que es un punto de preocupación de seguridad para los consumidores debido a la toxicidad inherente de la materia prima, aumentando así la demanda de astaxantina obtenida de fuentes biológicas como levaduras, crustáceos, peces y microalgas (4,5).

De las fuentes antes mencionadas las microalgas, son las más utilizadas, especialmente el género *Haematococcus* que puede acumular entre 3,8 a 5,0% de su peso seco dependiendo de las condiciones de cultivo y del diseño del fotobiorreactor, que es la mayor concentración en comparación a el resto de las fuentes naturales (5).

En la actualidad, una biosíntesis a gran escala de astaxantina a partir de *H. pluvialis* sigue teniendo desafíos, como; inducir la cepa a producir astaxantina, llevar el cultivo a etapa móvil verde y evitar muerte celular en la etapa inmóvil roja (3). Para el paso de una fase a otra se debe inducir la producción de carotenoides en otras palabras “estresar” la cepa *H. pluvialis*, una vez hecho esto, las células vegetativas verdes se transformarán en células rojas inmóviles que llevan dentro la astaxantina, no obstante, llevar la cepa de una fase a otra trae dificultades consigo (6). Diversos factores y métodos de inducción a estrés para la obtención y extracción de astaxantina de *H. pluvialis*, han sido reportados, sin embargo, en investigaciones se ve comparaciones entre dos o tres metodologías, sin embargo, hasta la fecha no se ha realizado una comparación de la vasta cantidad de métodos para hallar de todos, el más eficiente (6,7).

Este trabajo, pretende evaluar los procesos y métodos más eficientes para la producción de este carotenoide. Analizar las estrategias de cosecha y extracción para la mejora de procesos, utilizando métodos amigables con el medio ambiente y obtener de forma óptima y poco costosa astaxantina de *Haematococcus sp.* Así mismo, esta investigación puede ser usada como base para la producción local, con el fin de obtener mejores y más baratos productos de astaxantina para su uso o consumo, que a su vez mejoraría las condiciones de vida de la población en general, aminorando la cantidad de casos de enfermedades provocadas por estrés oxidativo, enfermedades degenerativas, malnutrición y cáncer.

Los resultados de esta investigación incrementaran el conocimiento que tenemos para la obtención de este principio activo de gran interés económico, ya que la mayoría de las publicaciones se centran en las diferentes formas de optimizar tecnologías y procesos para la a escala piloto de laboratorio sin evaluar las técnicas eficientes para su escalamiento a industria, este es el conocimiento vacío que este trabajo pretende llenar.

OBJETIVOS

Objetivo General

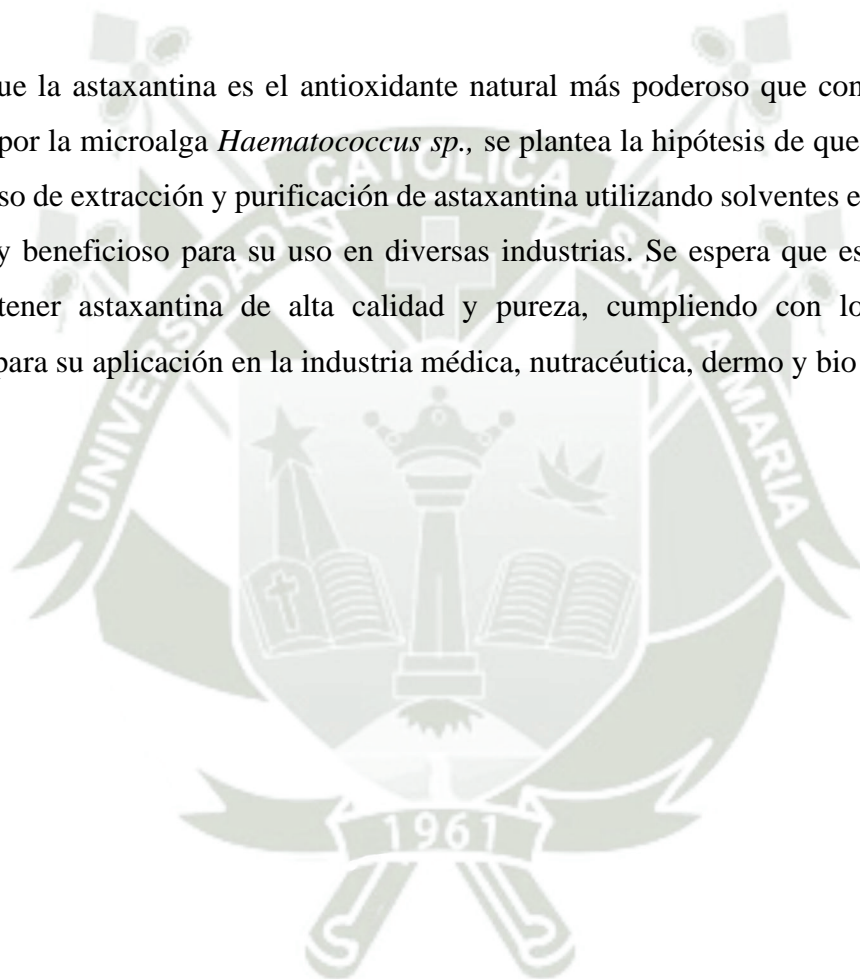
- Desarrollar del Down stream óptimo para la cosecha de biomasa, extracción y purificación de astaxantina, obtenida de cepas *Haematococcus sp.* con un solvente eco amigable para su uso en la industria médica, nutracéutica dermo y bio-cosmética.

Objetivo Específicos

- Cultivar *Haematococcus sp.* para la obtención de biomasa.
- Identificar los parámetros para inducir la producción de astaxantina en *Haematococcus sp.*.
- Comparar e identificar el método óptimo para la extracción de astaxantina con un solvente eco-amigable.
- Dilucidar los parámetros adecuados para una mejor extracción de astaxantina para obtener la mayor cantidad de principio activo.
- Purificar la astaxantina obtenida de las cepas *Haematococcus sp.*.

HIPÓTESIS

Debido a que la astaxantina es el antioxidante natural más poderoso que conocemos y es sintetizado por la microalga *Haematococcus sp.*, se plantea la hipótesis de que el desarrollo de un proceso de extracción y purificación de astaxantina utilizando solventes eco amigables es factible y beneficioso para su uso en diversas industrias. Se espera que este desarrollo permita obtener astaxantina de alta calidad y pureza, cumpliendo con los estándares requeridos para su aplicación en la industria médica, nutracéutica, dermo y bio cosmética.



VARIABLES

VARIABLES	VARIABLE	INDICADORES	UNIDADES
<i>INDEPENDIENTES</i>	Temperatura	Temperatura	°C
	Concentración de sales	Concentración en medio	g/L
	Intensidad de luz	Niveles de exposición	Lm/W
	Tiempo de exposición UV	Longitud de onda	µg/L
<i>DEPENDIENTES</i>	Densidad celular	Concentración de biomasa	Células / mL OD, Absorbancia
	Concentración de astaxantina	Peso seco	µg/mL

CAPÍTULO I

MARCO TEÓRICO

1. ASTAXANTINA

1.1 Estructura y características químicas de la astaxantina

La astaxantina es un antioxidante carotenoide, comprendido en una familia que abarca más de 600 pigmentos sintetizados de plantas, musgos, hongos, bacterias y microalgas, tiene la fórmula molecular de $C_{40}H_{52}O_4$ y un peso molecular de 596,86 g/mol (9). Su punto de fusión de aproximadamente 224 °C es insoluble en solución acuosa y en la mayoría de los disolventes orgánicos (9).

Debido a los carbonos quirales que contiene la molécula, existen cuatro configuraciones de astaxantina, sus diferencias radican en la configuración del grupo hidroxilo en los centros quirales, si por ejemplo el grupo hidroxilo se proyecta hacia arriba del plano de la molécula, esta se denomina “configuración R” y si el grupo hidroxilo se proyecta hacia abajo se denomina “configuración S” (10). Los isómeros de astaxantina son, dos enantiómeros (3S, 3'S), (3R, 3'R) y un mesómero (3R, 3'S). El isómero (3S, 3'S) se forma predominantemente en la biosíntesis natural de astaxantina por la cepa de *Haematococcus sp.* (10).

Los carotenoides se pueden dividir en dos grupos en función de los elementos químicos que contienen en sus moléculas: carotenos, que sólo contienen carbono e hidrógeno; y xantofilas, que también contienen oxígeno, entre las xantofilas el oxígeno puede estar presente como grupo hidroxilo, grupos carbonilo o como una combinación de ambos, como es el caso de la astaxantina, por pertenecer a esta clase comparte muchas de las funciones metabólicas y fisiológicas actividades atribuidas a los carotenoides en general; sin embargo, la astaxantina tiene otras propiedades químicas peculiares debido a su estructura molecular (11,12).

La estructura de los carotenoides se deriva del licopeno. La mayoría son hidrocarburos de 40 átomos de carbono que contienen dos sistemas de anillos terminales unidos por una cadena de dobles enlaces conjugados o sistema de polieno *Figura 1.*, este les da a los carotenoides una estructura molecular distintiva, propiedades químicas y su capacidad de absorción de luz (13).

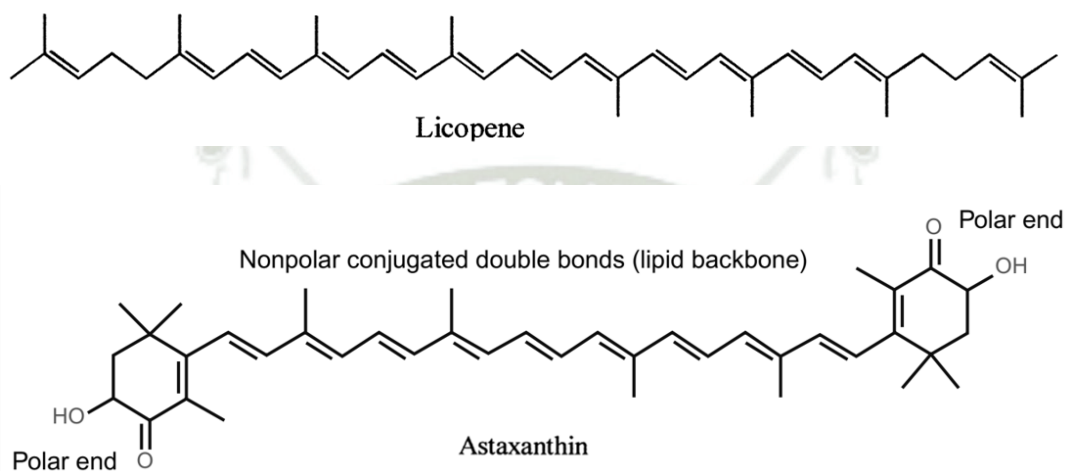


Figura 1. Estructuras químicas del licopeno y astaxantina (14).

1.2 Bioquímica de la astaxantina

Su molécula tiene enlaces dobles conjugados, grupos ceto e hidroxilo, que contienen propiedades lipofílicas e hidrofílicas, ya que tiene una estructura polar en cada extremo de la molécula y una estructura no polar en el medio, este tipo de estructuras polares con anillos de ionona tienen una potente capacidad antioxidante para extinguir el oxígeno singulete u otros oxidantes como el radical superóxido (O_2^-) y peróxido de hidrógeno (H_2O_2), evitando o cesando las reacciones en cadena. Por lo tanto, la astaxantina actúa tanto dentro como fuera de la membrana celular y puede proteger la bicapa lipídica contra peroxidación (15).

La presencia de grupos funcionales hidroxilo y carbonilo en los cetocarotenoides, como la astaxantina, los hace excelentes antioxidantes, este alto poder antioxidante ha demostrado efectos beneficiosos sobre la etiopatogenia de diversas enfermedades relacionadas con los radicales libre y el daño por estrés oxidativo,

como la hipertensión, obesidad, degeneración molecular y cáncer (11). Es por su estructura que la astaxantina mostró mejores resultados de actividad biológica que otros antioxidantes, ya que puede vincularse con la membrana celular desde el interior hacia el exterior (16)

Los grupos extremos polares se superponen a las zonas límite polares de la membrana, mientras que los no polares el medio se ajusta al interior no polar de la membrana (15,16).

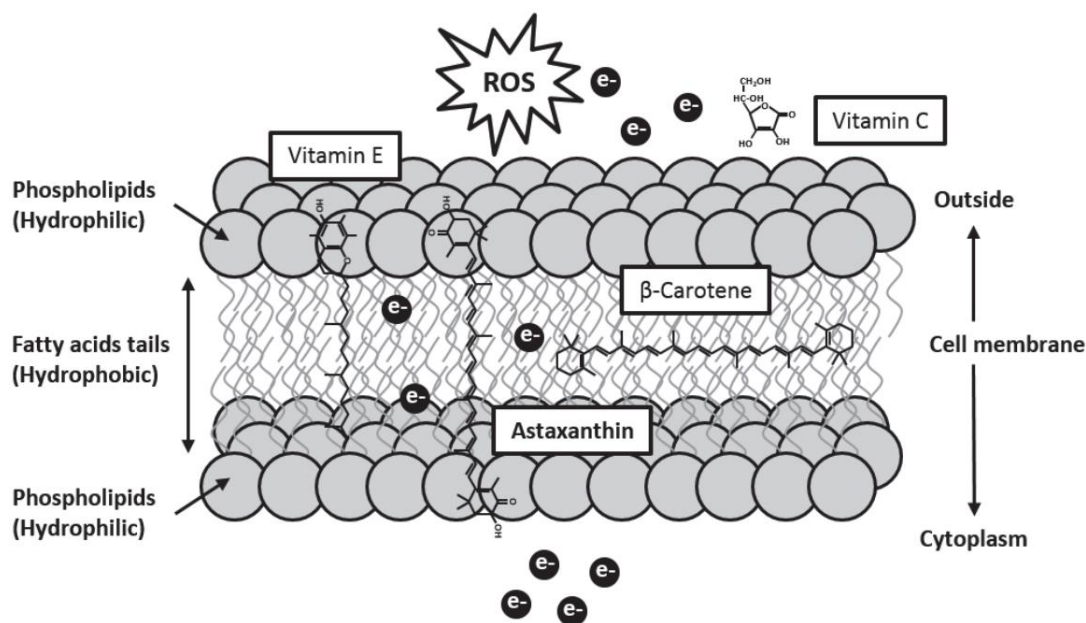


Figura 2. Comparación de la posición de antioxidantes en la membrana celular (16).

Su molécula también contiene *Figura 1.*, anillos de ionona 2-β y una cadena de polieno conjugado en el centro con grupos hidroxilo y ceto, lo que permite el libre enfriamiento radical de la membrana celular (4,10). Contiene 13 dobles enlaces conjugados alternando con enlaces simples-dobles, lo que le da una capacidad antioxidante significativamente fuerte contra los radicales libres y ROS (17). Debido a estas excepcionales propiedades, la astaxantina atrae una gran cantidad de interés para agregarse como ingrediente bioactivo en nutraceuticos, farmaceuticos, cosméticos y otros productos de cuidado personal (2).

1.3 Actividad biológica y sus aplicaciones

La astaxantina se ha mantenido con alto valor de mercado por sus aplicaciones y beneficios para la salud, esta se comercializa como suplemento humano, pero actualmente la aplicación principal de la astaxantina sigue siendo alimentación acuícola, es atractivo para el consumidor por la pigmentación y como excepcional componente nutricional para un adecuado crecimiento y reproducción de peces (9). En estudios recientes se ha evaluado el potencial de extractos de astaxantina para ser utilizados como agentes de tintura natural para textiles, contemplando el reemplazo de colorantes sintéticos por contrapartes naturales (12).

<i>NIVEL</i>	<i>ACCIÓN</i>	<i>REFERENCIA</i>
<i>Celular</i>	Actividad antioxidante: reduce daño de la oxidación del ADN.	(18)
<i>Hepático</i>	Efecto hepatoprotector.	(19)
<i>Cerebral</i>	Neuro protector: agente protector de neurocitos.	(20)
	Mejorar la función cerebral: rendimiento cognitivo.	(21)
<i>Tisular</i>	Inhibir la peroxidación lipídica evitando daño y muerte celular.	(17)
<i>Metabólico</i>	Inhibe la grasa corporal.	(22)
<i>Cáncer</i>	Agente quimioterapéutico y quimiopreventivo de cáncer.	(23)
<i>Cardiovascular</i>	Protección cardiovascular.	(24,25)
	Prevención de enfermedades inflamatorias.	(26)
<i>Sistema Inmune</i>	Prevención de infecciones bacterianas.	(27,28)
	Agente para aliviar la insuficiencia vascular.	(25,29)
<i>Esqueleto</i>	Reducción del dolor articular y síntomas de la osteoartritis.	(30,31)
<i>Sistema Gástrico</i>	Reducción de marcadores para úlceras gástricas.	(32)
<i>Sistema Reprodutor</i>	Incremento de la velocidad espermática y reducción de marcadores de oxidación.	(33)

Tabla 1. *Data resumida de la investigación clínica humana con astaxantina.*

Fuente: *Elaboración propia.*

Por su actividad antioxidante tiene un potencial extraordinario en la industria de la salud ya que ayuda a proteger el organismo contra una amplia gama de dolencias y patologías como problemas cardiovasculares, diferentes tipos de cáncer y enfermedades del sistema inmunológico (6).

1.3.1 Aplicación en la industria nutracéutica

La astaxantina es uno de los carotenoides más antiguos aislados e identificados (34). Primero fue utilizado comercialmente como un aditivo para la industria de la acuicultura, donde se añade para la pigmentación tisular. Posteriormente, la Administración de Drogas y Alimentos de los Estados Unidos - FDA, aprobó la astaxantina como suplemento nutricional dietético humano en 1999 (34).

Como antioxidante, la astaxantina ha demostrado tener efectos nutracéuticos y farmacéuticos contra enfermedades cardiovasculares, enfermedades oculares degenerativas, diabetes e inflamación y actividad contra algunos tipos de cáncer como oral, colon e hígado cánceres. Su poder antioxidante es 500 veces más fuerte que la vitamina E, 65 veces más activo que la vitamina C y es mucho más efectivo que otros carotenoides como la luteína y licopeno (11). Es más eficaz en la eliminación de radicales libres, lo que permite la reducción del daño a nivel ADN, protección de las células de los ojos, de la piel contra la fotooxidación y mejora la salud del corazón al modificando los niveles sanguíneos de colesterol LDL y HDL (22). La búsqueda de la astaxantina para productos; nutraceúticos, dietético y de suplementación en alimentos ha aumentado la demanda su producción natural (35).

1.3.2 Aplicación en la industria demo cosmética

El mercado mundial de cosméticos ha mostrado un crecimiento continuo y en los últimos años explosivo debido a la preocupación por conservar una apariencia física juvenil y saludable. Los cosméticos son productos destinados

para limpiar, embellecer, promover el atractivo o alterar la apariencia sin afectar la estructura o funciones del cuerpo (36).

Las formulaciones cosméticas, basadas en ingredientes bioactivos microalgales, como la astaxantina son cada vez más populares ya que la mayoría de ellos están asociados con compuestos fotoprotectores de la piel, a este pigmento y carotenoide, se le considera con un excelente potencial como ingrediente cosmético ya que puede bloquear los efectos de las especies ROS, suprimir la alteración celular y daño de la piel humana, a la vez proporciona foto protección de la piel contra la luz ultravioleta, además su efecto antiinflamatorio y antioxidante contribuyen a la protección de la piel, estas diversas funciones biológicas encajan en una amplia gama de aplicaciones dermo y biocosméticas (37).

I. Efecto fotoprotector de la piel

Aunque la radiación ultravioleta de la luz solar es importante para la piel humana porque promueve la síntesis de vitamina D, puede alterar las moléculas biológicas y causar daños en la piel, como el envejecimiento, la muerte celular (38). Esto es porque la radiación UV penetra las capas de la piel y genera ROS que dañan directamente el ADN, lo que puede causar mutaciones genéticas en varios genes importantes e inducir cáncer de piel (37).

La astaxantina es una sustancia antioxidante no enzimática y según estudios reduce el efecto perjudicial de la radiación en la piel, porque puede proteger la piel de la exposición a los rayos UV con una suplementación a razón de MED (Dosis Mínima Eritémica) que es la dosis de radiación UV efectiva que causa un enrojecimiento perceptible en la piel no expuesta previamente, y los resultados dieron un incremento del MED lo que significa que la piel tratada con astaxantina requeriría de una mayor exposición a los rayos UV para ser dañada (39).

II. Efecto hidratante y antienvjecimiento en la piel

La astaxantina es un ingrediente activo que pueden penetrar la piel y proteger la piel humana de la radiación y de contaminantes en el aire. Sus propiedades la hacen capaz de contrarrestar los efectos negativos en la piel humana como la reducción de la humedad y elasticidad, que inducen arrugas prematuras y aumentan la textura áspera de la piel (40).

Se han realizado una serie de estudios y pruebas clínicas para demostrar la eficacia de la astaxantina, se investigó los tratamientos con astaxantina para reducir cambios en la superficie de la piel, su data dio como resultado un aumento de la humedad y la elasticidad de la piel en el 2006 (40). Una evaluación dermatológica en el 2020 por Singh K. mostró una reducción significativa de arrugas y mejora de la hinchazón de la piel en la parte inferior del ojo y las mejillas después de 2 semanas de tratamiento tópico con una crema a base de astaxantina, también ha informado que astaxantina derivada de *H. pluvialis* es efectiva para la hidratación profunda de la piel (41).

III. Efecto cicatrizante

La participación de la astaxantina puede estimular el proceso de curación al mantener el nivel de estrés oxidativo, ya que este antioxidante frena la principal fuente de ROS y NADPH oxidasa, en la membrana plasmática de neutrófilos y macrófagos, el bajo nivel de estrés oxidativo reduce la producción de citocinas proinflamatorias, lo que conduce a una baja inflamación (42).

A su vez la cicatrización de heridas marcha mejor cuando la inflamación es mínima, la astaxantina estimula la migración y proliferación de queratinocitos, células endoteliales y células musculares lisas hacia el sitio de la herida en la fase de proliferación de la cicatrización de la herida La migración de queratinocitos promueve la queratinización que beneficia el proceso de curación y conduce entonces a acelerar cierre de herida (43).

IV. Efecto curativo en dermatitis

La dermatitis es una enfermedad de la piel que causa prurito, xerosis, inflamación y eritema, lesiones causadas por disfunción inmunitaria, alérgenos o patógenos. Una barrera cutánea defectuosa puede exacerbar la dermatitis y esta barrera anormal puede facilitar que alérgenos penetren profundamente en el cuerpo sin que el sistema inmunológico reconozca y de alarma para responder (44). El beneficio de la astaxantina viene en su naturaleza antioxidante, se puede administrar antioxidante para oxidar alérgenos, Trakanwittayarak S. et al, realizaron un pretratamiento en la piel con emulsión de astaxantina al 0,07% para evaluar si puede reducir la reacción provocada de la p-fenilendiamina, compuesto que irrita la piel, este pretratamiento dio como resultado un alivio a la respuesta alérgica, compuesta de inflamación y proliferación de mastocitos; se puede concluir que la astaxantina se puede utilizar para aliviar la dermatitis (45).

1.3.3 Aplicación en la industria médica

Con base en los resultados de múltiples estudios, la astaxantina ha sido reconocida como un antioxidante seguro para salud humana y eficaz contra diversas complicaciones de salud (46).

Investigación científica se ha realizado con astaxantina como un solo componente es decir al 80% o en combinación con nutrientes al 20%. Se ha reportado que esta reguló positivamente las expresiones de Nrf₂ en células irradiadas, así como de proteínas dirigidas a HO⁻¹ y enzimas como; antioxidante superóxido dismutasa tipo 2, catalasa y glutatión peroxidasa. Estos hallazgos demuestran que la astaxantina tiene actividad antioxidante no solo en la eliminación directa de radicales libres sino al desencadenar el sistema de defensa celular a través de la modulación de la vía Nrf₂ (47).

V. Actividad hepatoprotectora

La astaxantina exhibe efecto hepatoprotector contra lesiones hepáticas inducidas por etanol, bloqueando la actividad de STAT3, proteína que manda señalización celular que desencadena la apoptosis (19). En un modelo de ratones con resistencia a la insulina inducida por lipotoxicidad y esteatohepatitis, la astaxantina disminuyó el reclutamiento hepático de células T y polarización dominante de macrófagos sobre células de Kupffer, por lo tanto, atenuó la resistencia a insulina, la inflamación hepática y fibrosis (48). En el 2012 Turkez H et al., demostró el efecto protector de la astaxantina contra la lesión hepática inducida por TCDD en ratas, se demostró que la astaxantina mejora la fibrosis inducida químicamente a roedores; CCL4 y BDL y regular a la autofagia en células hepáticas (49,50).

VI. Actividad cardioprotectora

El tratamiento con astaxantina a conejos hipercolesterolémicos mostró una reducción del estrés oxidativo, estos animales de experimentación fueron alimentados con astaxantina y se mostró un flujo sanguíneo arterial basal mejorado además de efectos cardioprotectores (24). Se utilizó astaxantina al 0.08% y mostró un índice mejorado de contractilidad del miocardio entre ratones de control y los ratones alimentados con astaxantina (51).

En otro caso de estudio, la administración de astaxantina al, 25, 50 y 75 mg/kg durante 4 días redujo significativamente el tamaño del infarto de miocardio y mejoró la función miocárdica (52,53). En otro estudio la astaxantina al 50 mg/kg/día disminuyó la inflamación del miocardio y por lo que mejoró la función miocárdica en un modelo de conejo con isquemia-reperfusión (54). El pretratamiento oral de astaxantina al 125 y 500 mg/kg/día durante 7 días en ratas les ofreció protección cardiovascular (55).

VII. Actividad en protección ocular

La astaxantina inhibió la muerte celular de la retina inducida por isquemia y la producción de ROS de una forma dependiente a su concentración, mostró protección contra la progresión del ojo seco y la degeneración macular relacionada con la edad y glaucoma (56). Además, la ingestión de astaxantina al 4-12 mg/día durante 28 días mejoraron significativamente la agudeza visual lejana no corregida y el tiempo de acomodación visual en voluntarios (57).

VIII. Actividad antidiabética

La diabetes es un trastorno metabólico caracterizado por hiperglucemia debido a una secreción o acción de insulina inadecuada. El estrés oxidativo mediado por hiperglucemia es el principal factor responsable de la patogenia de la diabetes (58). Utilización de antioxidantes para mejorar el estrés oxidativo puede ser una estrategia eficaz para combatir la diabetes asociada a complicaciones de salud, estudios han informado el efecto antidiabético de la astaxantina en modelos diabéticos in vitro e in vivo. Kumar et al. afirmó que la astaxantina reduce la glucosa en la sangre y niveles de triglicéridos en ratones modelo obeso/diabético y mejora la sensibilidad a la insulina (59).

Además, informaron que la astaxantina suprimió la fosforilación serina de sustratos del receptor de insulina y aumento de la fosforilación de Akt en el hígado, mejorando así la sensibilidad a la insulina (60).

IX. Actividad antiobesidad

Se ha traído atención a la astaxantina en la investigación relacionada con la obesidad debido a sus potentes características antioxidantes. En adultos obesos, la suplementación con astaxantina resultó ser una mayor respuesta antioxidante por supresión de la peroxidación

lipídica. Yang et al. probó que la suplementación con astaxantina reduce concentraciones plasmáticas de TAG, ALT y AST, aumentó la expresión hepática de genes antioxidantes endógenos y redujo la sensibilidad de los esplenocitos a la estimulación con LPS, por lo tanto, la astaxantina puede prevenir las alteraciones metabólicas y la inflamación asociadas con la obesidad (61). La astaxantina mejoró la resistencia a la insulina, que es una complicación relacionada con la obesidad al desencadenar señalización de insulina post receptora en ratones en una dieta rica en calorías, a su vez redujo el peso corporal y los niveles lipídicos en músculos adiposos y esqueléticos (62).

X. Actividad anticancerígena

Esencialmente debido a su fuerte actividad antioxidante, la astaxantina ha demostrado tener excepcional actividad contra algunos tipos de cáncer como oral, piel, colon e hígado (12). Se demostró que la astaxantina posee eficacia antitumoral preclínica tanto in vitro como in vivo en varios modelos de cáncer, en su estudio la astaxantina indujo la regulación negativa del gen XPC mediada por la señalización de MAPK del p38, mejorando así la citotoxicidad inducida por Erlotinib (medicación de cáncer de pulmón), en células A549 y H1975 (63). En otra investigación el tratamiento de astaxantina suprimió el crecimiento tumoral e inhibió el cáncer de páncreas dirigido a los genes hENT1, RRM1 y RRM2 (8).

XI. Actividad antiinflamatoria

Este antioxidante exhibió un efecto de bloqueo antiinflamatorio al bloquear la translocación nuclear de RelA y la degradación I κ B α (64). En un modelo de inflamación de la piel, la astaxantina inhibió la producción de mediadores inflamatorios al bloquear la activación de NF- κ B en queratinocitos humanos (65).

Recientemente, Park et al. demostró que la astaxantina en un modelo de dermatitis atópica, los animales inhibieron la expresión génica de citocinas proinflamatorias como la interleucina-1 β , interleucina-6 y factor de necrosis tumoral- α (66).

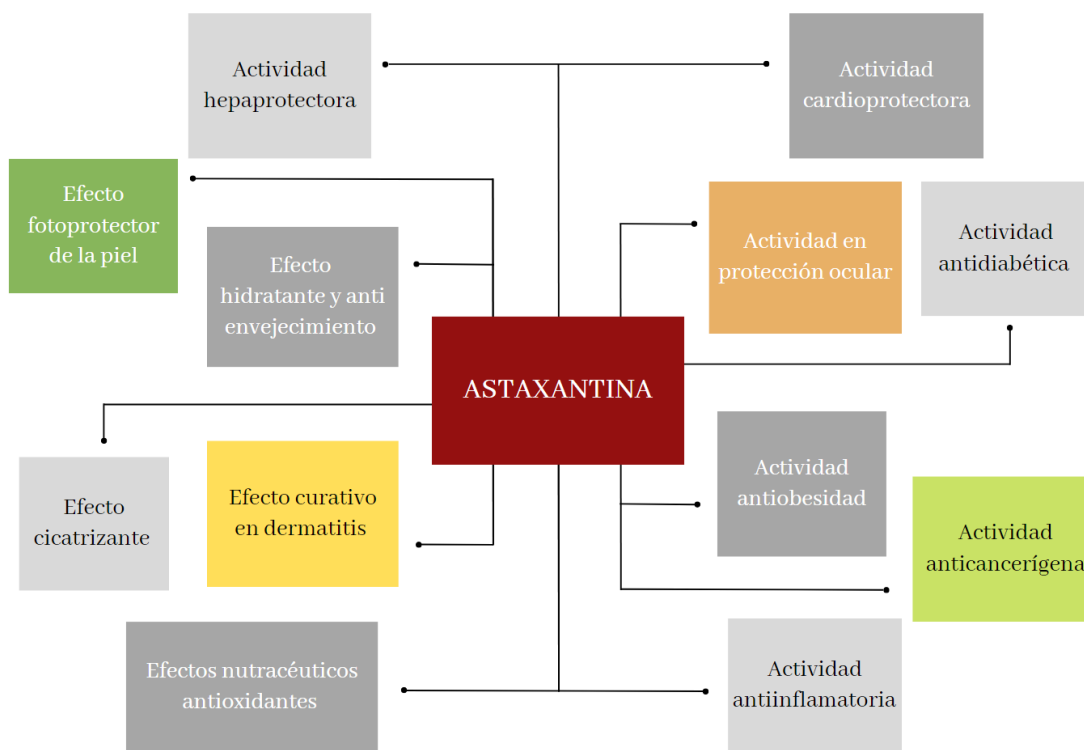


Figura 3. Mapa resumen de los múltiples beneficios de la astaxantina a la salud.

Fuente: *Elaboración propia* (46,67).

1.4 Fuentes de astaxantina

Varias iniciativas de investigación están en curso en todo el mundo sobre la astaxantina, sus fuentes, métodos eficientes de extracción y diversas actividades biológicas que son útiles para su uso en las industrias de la salud, por su habilidad antioxidante, antiinflamatoria y anti apoptótica (13). En estas investigaciones se ha encontrado que forma natural de astaxantina es más biológicamente activa que su contraparte sintética (68).

En cuanto a su método de producción: La astaxantina sintética se produce mediante síntesis química, mientras que la astaxantina natural se deriva de fuentes naturales como microalgas, levaduras y subproductos de crustáceos. La astaxantina sintética es generalmente más barata que la astaxantina natural porque el cultivo y la recolección de microalgas para la producción de astaxantina natural pueden resultar costosos (69).

La esterificación de la molécula también es muy importante, se refiere a la unión de ácidos grasos a la molécula de astaxantina. La astaxantina sintética en su mayoría no está esterificada, mientras que la astaxantina natural está esterificada. Esta diferencia en la esterificación puede afectar la biodisponibilidad y estabilidad de la astaxantina. En cuanto a su actividad antioxidante, se ha descubierto que la astaxantina natural es superior a la astaxantina sintética como antioxidante. Ofrece más de 20 veces más protección en comparación con la astaxantina sintética (11). Es importante señalar también que, si bien la AX sintética está ampliamente distribuida y disponible en el mercado, la AX natural procedente de algas y animales acuáticos ha mostrado mejores beneficios en términos de acumulación de astaxantina, seguridad y calidad nutritiva potencial (69).

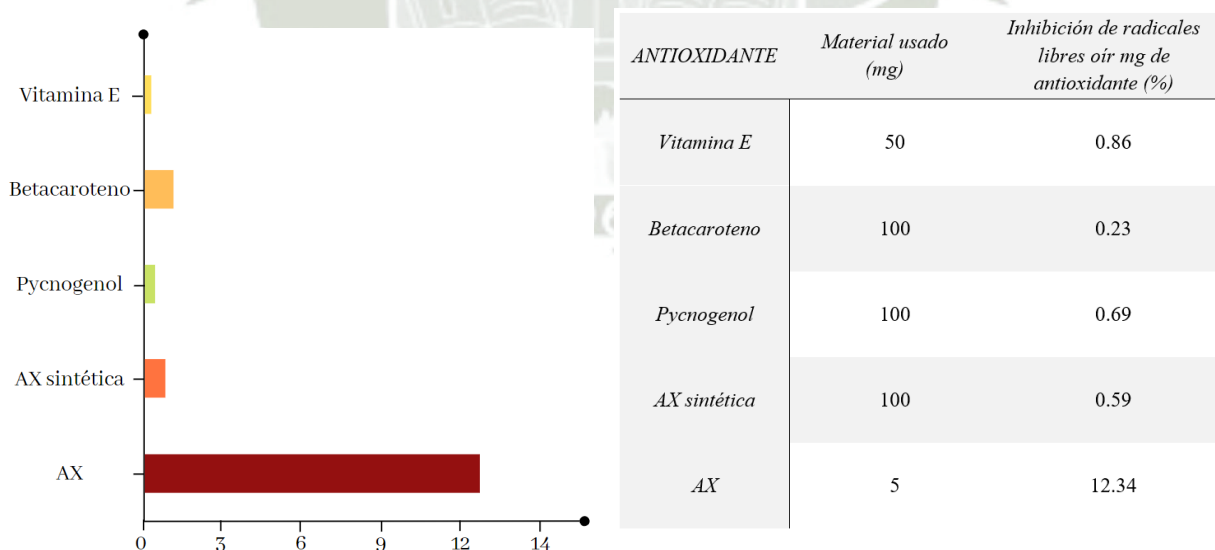


Figura 4. Potencia de eliminación de % radicales libres por mg de diferentes antioxidantes (69).

Tabla 2. Inhibición de % radicales libres por mg de diferentes antioxidantes (69).

1.4.1 Fuentes sintéticas

La astaxantina se sintetiza por algunas cepas de algas, bacterias y también puede ser producido sintéticamente en un laboratorio, a esta última se le denomina, sintética para diferenciarla de la natural, se puede producir industrialmente de varias formas, pero generalmente se sintetiza químicamente a partir de fuentes petroquímicas como el petróleo (9).

Sin embargo, por regulación de la FDA, la astaxantina es un aditivo de color de alimentos aprobado que se permite para su uso en coloración de alimentos para humanos, pero no en otras formas de uso incluyendo médicas, cosméticas ni nutraceúticas ya que su seguridad no está completamente establecida, sin embargo, se ha encontrado que la astaxantina sintética se vende como astaxantina natural en algunos suplementos alimenticios y productos de cuidado personal lo que es ilegal (69).

1.4.2 Fuentes naturales

Astaxantina se puede producir en laboratorios utilizando microorganismos, utilizando métodos de cultivo y extracción, aunque este es el método menos común, la astaxantina sintética tiene una capacidad antioxidante 20 veces menor que la natural derivada de las microalgas (69).

La microalga *Haematococcus pluvialis* es el organismo no modificado genéticamente con mayor capacidad para sintetizar y acumular astaxantina. Otras fuentes naturales de astaxantina incluyen el salmón rojo salvaje, el krill, la trucha roja, la langosta, el cangrejo, el camarón, la cigala, el huevo de salmón y la lubina roja (9). La astaxantina tiene una gran demanda en aplicaciones alimentarias, de piensos, nutracéuticas y farmacéuticas. Esto ha promovido importantes esfuerzos para mejorar la producción de astaxantina a partir de fuentes naturales por la superioridad contra sus contrapartes sintéticas (70).

2. *HAEMATOCOCCUS SP.*

2.1 Distribución y aspectos fisiológicos

Haematococcus sp. es una microalga verde unicelular de agua dulce con un ciclo de vida bastante complejo por poseer importantes funciones fisiológicas, entre ellas, la producción de astaxantina (71). La astaxantina producida por el género *Haematococcus sp.* es la fuente más rica de astaxantina natural conocida (71,72). Esta especie está distribuida por todo el mundo, ha sido reportada en todos los continentes exceptuando Antártida. Se ha aislado de rocas, cortezas, charcos de lluvia, incluso del agua bendita. Su habitat más común son aguas estacionales y cuando las condiciones de ese curso de agua dejan de ser óptimas, la *Haematococcus sp.* se “estresa” enquistada, como respuesta al medio (72). La cepa *H. pluvialis* es beneficiosa para la salud humana y es importante para uso comercial, sin embargo, rara vez prevalece en cuerpos de agua dulce permanentes, el aumento de los contaminantes ambientales amenaza la amplia distribución de *H. pluvialis* (1,71).

2.2 Clasificación taxonómica y composición

Según la base de datos de Taxonomía del Centro Nacional de Información de Biotecnología, *Haematococcus sp.* pertenece al género *Haematococcus* y a la familia *Haematococcaceae* (73).

Su composición bioquímica está estrechamente relacionada y depende de la etapa en que la célula se encuentre, ya bien este en la etapa verde o roja. Durante su etapa verde las células están constituidas por proteínas en un 29-45%, por lípidos entre un 20-25% y en un 10-30% de pigmentos como clorofila A y B, carotenoides primarios y xantofilas (74). En la etapa roja el porcentaje de proteínas disminuye a 21-23%, aumenta su acumulación de lípidos a conformar hasta el 40% de su peso y el contenido de carotenoides aumenta considerablemente hasta desplazar el porcentaje de otros pigmentos y ser remplazados principalmente por astaxantina, en esta etapa, los ésteres de astaxantina llegan a constituir hasta el 99% del perfil total de carotenoides (74,75).

2.3 Ciclo de vida y cambios fisiológicos

La biosíntesis de la astaxantina está acompañada de la transformación de células vegetativas verdes y ovoides a células rojas enquistadas en condiciones no óptimas como; deficiencia de nutrientes, salinidad y altas temperaturas, en combinación con alta irradiación, conllevando a la mayor síntesis de astaxantina. Si las condiciones vuelven a ser favorables para su crecimiento, los quistes rojos explotan germinando y liberando una gran cantidad de nuevas células móviles flageladas con centro rojo que se ira tornando verde de nuevo (76).

En sus etapas de crecimiento, tiene dos formas flageladas móviles y no móviles., En su forma móvil la célula tiene forma de pera y un tamaño de entre 8 a 50 mm la estructura celular está conformada por un cloroplasto en forma de copa con numerosos pirenoides, vacuolas, un núcleo y dos flagelos que emergen de la pared celular en un ángulo amplio. En su forma no flagelada inmóvil, también llamada etapa de palmella, el protoplasto esférico está envuelto dentro de un tejido muy adherente “membrana palmella”, y con la excepción de los dos flagelos, la estructura celular sigue siendo la misma que su forma móvil (5,6,76).

Cuando las condiciones de crecimiento se vuelven desfavorables, las células aumentan su volumen drásticamente para entrar en una etapa de reposo en la que la célula está rodeada por una pared de celulosa resistente y pesada, este proceso se denomina “enquistamiento”. El protoplasto se torna de un color rojo sangre, debido a la astaxantina y a esta etapa final de síntesis de astaxantina se le denomina aplanóspora (74).

A estos cambios celulares también se les conoce con el nombre de carotenogénesis así que el ciclo de la cepa *Haematococcus sp.* como resultado de su respuesta a diferentes condiciones y estímulos se pueden distinguir 3 etapas morfológicas:

- Vegetativa: Etapa verde donde se da el crecimiento celular y en esta etapa tienen forma ovalada y son biflageladas.
- Palmella: Etapa verde con forma esférica grande, estática y sin flagelos.
- Aplanóspora: Etapa roja en la cual se da la acumulación de astaxantina lo que le da la tonalidad roja en esta etapa tienen forma esférica grande y no presentan flagelos.

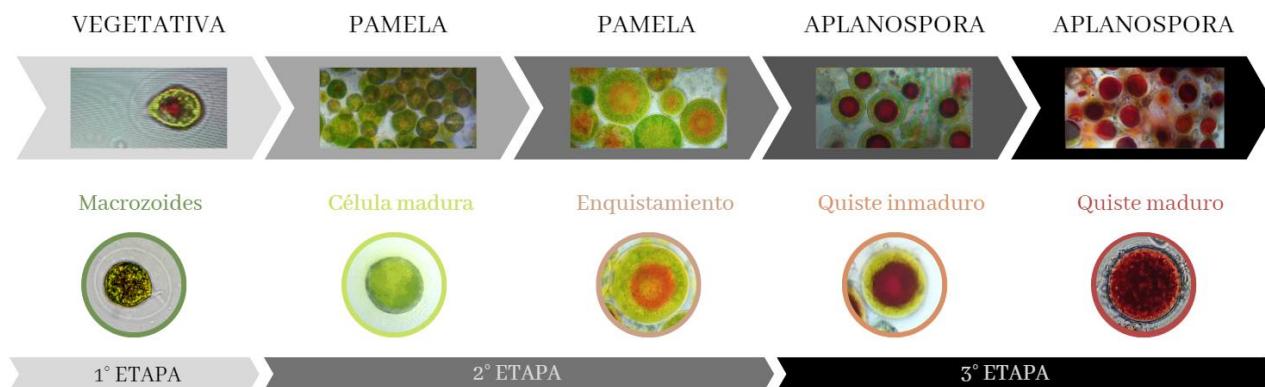


Figura 5. Ciclo de la cepa *Haematococcus sp.*

Fuente: *Elaboración propia* (7,74).

2.4 Biosíntesis de astaxantina en *Haematococcus sp.*

Esta microalga tiene la capacidad de sintetizar una gran cantidad de astaxantina con respecto a su peso neto, esta síntesis y acumulación de astaxantina se da como respuesta celular a condiciones de estrés y va acompañada de la biosíntesis de triacilglicerol, mono ésteres y di ésteres de ácidos grasos, lo que conlleva a la reducción de la actividad fotosintética y producción de clorofila (77).

2.4.1 Principios biológicos y tecnología para cultivo de *Haematococcus sp.*

El proceso biológico de producir biomasa algal requiere de condiciones bien definidas, las microalgas necesitan de condiciones específicas de cultivo para su crecimiento masivo como: luz, pH y temperatura adecuados, así como un suministro apto de carbono y nutrientes (78).



Ecuación 1. Ecuación de energía a partir de biomasa (78).

Debido a que la biomasa de microalgas crece en suspensiones densas, se requiere turbulencia, burbujeo o algún tipo de movimiento para exponer las células a todas las condiciones anteriormente mencionadas para posibilitar

una transferencia de biomasa eficiente. Además, un cultivo exitoso requiere un monitoreo de los parámetros fisicoquímicos continuo (74,78).

El recipiente del medio de cultivo también es importante, el más simple es un matraz iluminado que contiene medio líquido adecuado para la cepa, con algún mecanismo de agitación, pero hay innumerables variaciones de diseños para el aumento exponencial de biomasa de cada cepa (79).

La luz es el factor más importante para el crecimiento de las microalgas, la cantidad de energía fotónica recibida por cada célula es una combinación de varios factores como: densidad de flujo de fotones, densidad celular, longitud del camino óptico y efectividad de la mezcla, según la literatura para *Haematococcus sp.* se requiere de un fotoperiodo de luz de 12 o 16 horas y oscuridad de 12 o 8 horas, también conocido como abastecimiento de luz tipo “daylight”, este parámetro es recomendado para experimentación ya que es la única forma de llevar un control de la exposición a luz, se puede abastecer de energía lumínica al medio artificialmente con lámparas fluorescentes de 50 a 600 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$ (78,79).

Después de la luz, la temperatura es el parámetro más importante en las primeras investigaciones la temperatura se fijó principalmente en aproximadamente 25 °C para el cultivo de *Haematococcus sp.* en fase verde en laboratorios (80), una investigación más reciente demostró que temperatura tiene efectos en la función fotosintética de *Haematococcus sp.*, tanto que las tasas de división celular y los tamaños de las células se vieron afectados por las condiciones de temperatura, dando como resultado que las cepas de *Haematococcus sp.* estudiadas tenían una tasa de división más rápida a 20 °C y un crecimiento de biomasa más rápido a temperaturas de hasta 30 °C (81). Un cultivo exitoso requiere de métodos de monitoreo, como: exámenes biológicos básicos bajo el microscopio, para detectar cambios morfológicos, daño celular, contaminación de otras microalgas, bacterias, hongos y protozoos, otros métodos incluyen, peso seco de la biomasa o el conteo celular, evaluar la tasa de crecimiento específica del cultivo con espectrofotometría a 750 nm generalmente (79,81).

2.4.2 Crecimiento y cosecha de biomasa

Las cepas de *Haematococcus sp.* por su tamaño, ciclos y prolongado metabolismo crecen lentamente por lo que son propensos a contaminación de otros microorganismos depredadores tales como: microalgas, parásitos fúngicos y zooplancton (72). Por lo que normalmente se emplean procesos en etapas para la producción de biomasa distinguidas por el ciclo celular verde y rojo; la etapa “verde” comienza con el cultivo de células vegetativas que generalmente se prolifera en fotobiorreactores cerrados bajo una intensidad de luz óptima de 12-16 horas y un medio repleto de sales y nutrientes, una vez alcanzada la máxima densidad celular que puede durar entre 2 a 4 semanas, se pasa a la etapa “roja”, donde se expone al cultivo a alta irradiación, inhibición de nutrientes, salificación, entre otros, para lograr inducir la síntesis de astaxantina esta etapa puede durar entre 5-12 días (7). Una vez terminadas ambas etapas, se da lugar a la “cosecha” que es la recolección de las células mediante métodos físicos como: centrifugación, filtración, sedimentación o flotación: la selección del método adecuado se realiza teniendo en cuenta las dimensiones del microorganismo (70,78).

2.4.3 Carotenogénesis, activación de la biosíntesis de astaxantina

El cambio fisiológico más notable en *Haematococcus sp.* se da durante la acumulación de astaxantina es la disminución de la fotosíntesis, esto se debe al daño en el fotosistema II, por la disminución de O₂, se ha demostrado que la cantidad de astaxantina celular está inversamente relacionada con la actividades fotosintéticas, por otro lado se requieren estudios bioquímicos y moleculares para identificar la exacta ubicación donde ocurre el daño del aparato fotosintético tras la exposición a las condiciones de síntesis de astaxantina (82). Hay muchas moléculas involucradas en el desencadenamiento de la síntesis de astaxantina, principalmente las especies reactivas del oxígeno, aunque se cree que la producción de ROS en organismos fotosintéticos es una consecuencia inevitable del funcionamiento de la cadena de transporte de electrones fotosintéticos en

una atmósfera con oxígeno, los cloroplastos son fuentes ricas de ROS ya que contienen reacciones altamente energéticas de la fotosíntesis y un abundante suministro de oxígeno, en condiciones óptimas para el crecimiento de *Haematococcus sp.*, la luz absorbida por los pigmentos de antena; clorofila A y B, se convierte en energía química formando ATP y NADPH a través de una cadena fotosintética de transporte de electrones, esta energía química se almacena en almidón mediante la fijación de CO₂ a través del ciclo de Calvin, sin embargo en condiciones de estrés, las ROS se producen cuando el equilibrio de energía fotosintética de entrada que es absorción de energía solar por los pigmentos de antena y de salida como la fijación de CO₂, se desequilibran, esto produce formación de O⁻² a través de la reacción de Mehler, que puede convertirse secuencialmente en H₂O₂ y HO (83), por otro lado, cuando la fijación de CO₂ está limitada por condiciones ambientales de estrés, como la escasez de nutrientes, alta salinidad, altas temperaturas o bajo nivel de CO₂, la producción de estos ROS puede ocurrir incluso en intensidad lumínica moderada por exceso de energía (82,83).

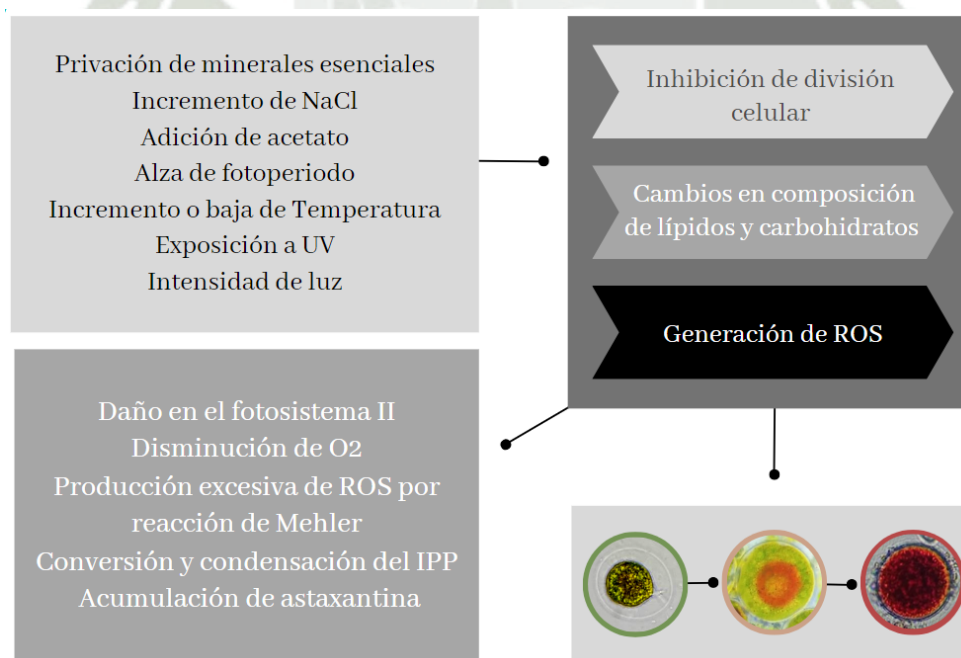


Figura 6. Factores en la activación de carotenogénesis en *Haematococcus sp.*.

Fuente: *Elaboración propia* (82).

Investigaciones han sugerido que la respuesta carotenogénica en *Haematococcus sp.* es mediada por ROS, las interrelaciones entre ROS y astaxantina en la respuesta al estrés y la foto protección no están claras, pero nuevos estudios revelan que las ROS o sus productos pueden regular la acumulación de astaxantina mediante la activación directa de enzimas biosintéticas latentes como el glutatión transferasa (84).

La astaxantina se da como resultado a la introducción del estrés, pero esta empieza como β -caroteno que se forma por la ciclación del licopeno después de una serie de conversión y condensación del pirofosfato de isopentenilo IPP, en fitoeno incoloro y deshidrogenación que conduce a la biosíntesis de astaxantina en *Haematococcus sp.* En la etapa verde, el β -caroteno es un producto final de la fotosíntesis en plantas y algas, también es el precursor para cetocarotenoides en el cloroplasto y el citosol (82,84). La oxigenación del β -caroteno por el β -caroteno cetolasa BKT, da lugar a la equinenona y la cantaxantina, si las condiciones de estrés se mantienen la *Haematococcus sp.* comienza a sintetizar astaxantina por la hidroxilación de la cantaxantina catalizada por la estructura de genes CrtR-b (85,86).

2.4.4 Extracción de astaxantina a partir de *Haematococcus sp.*

La molécula de astaxantina es lipofílica, puede disolverse en aceites y solventes. La extracción de astaxantina de *Haematococcus pluvialis* implica romper la pared celular para liberar el pigmento, además, para la extracción se necesita tener células enquistadas secas, biomasa en medio reduce la actividad de solventes (9). Existen varios métodos para la extracción de astaxantina de *Haematococcus pluvialis*, incluida la disrupción mecánica, la extracción química y la extracción con solventes, ácidos, aceites comestibles, asistidos por microondas y métodos enzimáticos (9,34).

I. Disrupción mecánica

La disrupción mecánica es la primera parte de la extracción ya que la extracción de astaxantina implica la ruptura de la pared celular,

esto se realiza mediante métodos como vortexado con micro perlas, homogeneización de alta presión, sonicación alta presión o temperatura elevada, son los métodos más usados por su simplicidad, pero puede llegar a causar degradación del pigmento debido al calor por fricción generado durante el proceso, se recomienda no realizarlos por mucho tiempo o realizar extracciones solo parcialmente mecánicas (9). Estudios han comparado las condiciones óptimas para la extracción de astaxantina de algal utilizando estos métodos, por ejemplo, un estudio de Wang et al. encontraron que el mayor rendimiento de astaxantina se obtuvo utilizando la extracción a una temperatura de 50 °C (87).

II. Extracción química

La extracción química necesita del uso de solventes tales como; etanol, acetona, cloroformo o hexano, para disolver en parte la pared celular y el pigmento de las células de algas, este método es el más efectivo, pero puede resultar en la contaminación con residuos del solvente (4,70). En un estudio de comparación diferentes métodos de extracción fueron evaluados y las metodologías químicas con mayor recuperación son las que usan solventes como acetona, etanol, metanol y hexano, con estos se obtiene una recuperación del 70-74 % de astaxantina de *Haematococcus pluvialis* (88).

3. MÉTODOS DE PURIFICACIÓN E IDENTIFICACIÓN

Después de la extracción del pigmento desde *H. pluvialis*, es necesario purificar el extracto para obtener un producto de astaxantina pura, la purificación implica separarla de otros pigmentos, lípidos e impurezas que puedan estar presentes en el extracto. Existen varios métodos para la purificación de la astaxantina, incluida la extracción con solvente y la cromatografía (9,73). Un método común consiste en realizar la extracción disolviendo el extracto en solventes y luego filtrarlo para

eliminar las impurezas lipídicas, es rápido y efectivo, pero puede terminar con contaminación por residuos del mismo solvente (76,89). La cristalización implica enfriar el extracto para precipitar la astaxantina y luego filtrar para obtener un producto purificado, este método es simple, pero puede resultar en bajas tasas de recuperación y baja pureza (90). La cromatografía implica el uso de una fase estacionaria, como sílice, carbón activado o alumina, para adsorber la astaxantina del extracto.

Este método es efectivo, pero requiere métodos especializados y puede llevar mucho tiempo (89). Se han realizados estudios para averiguar las condiciones óptimas para la purificación de astaxantina utilizando estos métodos. Por ejemplo, en el 2019 un estudio utilizó una combinación de extracción por solventes y cromatografía para purificar la astaxantina de *Haematococcus pluvialis*. Los autores optimizaron las condiciones para cada paso y obtuvieron un producto de astaxantina de alta pureza con un rendimiento del 87,5 % (89).

3.1 Cromatografía en capa fina o TLC

La cromatografía en capa fina o TLC es la técnica de cromatografía más común por su versatilidad para identificar carotenoides y astaxantina, se usa principalmente para separar pigmentos de acuerdo con su afinidad hacia la fase móvil y estacionaria, es decir, a mayor afinidad los compuestos se moverán más lentamente que otros, por lo tanto, da un valor de R_f más bajo (90). Para su práctica se aplica una pequeña cantidad de muestra a un extremo de una placa de TLC y se coloca en posición vertical en una cámara sellada que contiene un solvente o mezcla de solventes orgánicos a la que se conoce como la fase móvil, esta se desplaza sobre la placa por acción capilar, y los componentes de la muestra migran diferentes distancias dependiendo de sus diferentes afinidades por las fases estacionaria y móvil, una vez que el solvente llegue al tope de la placa, se retira la placa y se deja secar (91). En el caso del extracto de *Haematococcus sp.* la TLC purifica el extracto carotenoides concentrado a través de la separación de todos los pigmentos en este como, luteína, betacaroteno, clorofila A, astaxantina, y así

permite la identificación de los pigmentos a través de una comparación con el valor del factor de retención o R_f (91).

3.1.1 Cromatografía en capa fina bidimensional o TLC 2D

Esta cromatografía bidimensional usa el mismo principio de separación que la cromatografía en capa fina tradicional (92). Por lo tanto, la elección de solventes y el manejo y siembra de muestras se realiza de manera análoga. Sin embargo, esta técnica permite cambiar la solución eluyente en la segunda elución, mejorando la capacidad de separación de muestras complejas. Además, se puede utilizar esta técnica para comprobar la estabilidad de los compuestos presentes en la muestra con relación a la fase estacionaria, lo que puede ser útil para determinar si los parámetros de experimentación empleados son adecuados para la separación de dichos compuestos (92).

3.2 Cromatografía preparativa - C Prep

La cromatografía preparativa o C Prep es una técnica similar a la cromatografía en capa fina, pero esta permite no solo separar sino aislar los compuestos de una mezcla, se realiza mediante el uso de una columna de vidrio plana cubierta de alumina o sílice, se diferencia de una placa de capa fina en su grosor y en que una vez separados los compuestos del extracto de *Haematococcus sp.* estos pueden ser recuperados de la capa de sílice ya que retiene los pigmentos y por cálculo de los valores de los factores de retención se puede seleccionar el compuesto deseado y raspar la capa para su preservación, la purificación del compuesto de la capa de sílice es sencilla puesto que no se diluyen en los solventes normalmente usados para la extracción de pigmentos si no en soluciones isotónicas (93).

3.3 Barrido espectral de UV-Visible

La molécula de astaxantina se puede identificar mediante un barrido con espectrofotómetro de UV-Visible. Esta técnica se basa en la absorción de luz por parte de los pigmentos a diferentes longitudes de onda, la astaxantina tiene una

absorción máxima en el rango de longitud de onda de 470 a 480 nm, al realizar un barrido de UV en este rango, se puede detectar la presencia de astaxantina por la absorción de luz a esa longitud de onda específica (94).

3.4 Resonancia magnética nuclear - NMR

La resonancia magnética nuclear o RMN es una técnica analítica aprovechada para determinar la conformación molecular y la estructura química de una muestra. Funciona analizando las interacciones entre los núcleos atómicos que giran en un fuerte campo magnético (95). Usa una reducida cantidad de muestra que debe ser diluida en cloroformo deuterado y este es un ensayo no destructivo ya que la muestra es introducida en una columna que a su vez entra en el equipo de RMN y puede ser recuperada directamente de la columna una vez terminada la técnica el solvente se evapora y el compuesto puede ser recuperado (94).

La resonancia de la astaxantina proporcionará información sobre la estructura química de la molécula, incluyendo la identificación y asignación de señales de resonancia de los núcleos de la molécula además de determinar los grupos funcionales presentes, así como para analizar los patrones de acoplamiento de los núcleos y la estructura tridimensional de la molécula (95).

4. PRUEBAS ESTADÍSTICAS

4.1 Plackett–Burman design

El Plackett-Burman es un diseño experimental de cribado, resulta muy útil para determinar qué factores son realmente importantes en un experimento. En este tipo de diseño, aquellos factores que se consideran irrelevantes o que aportan ruido al experimento se descartan. De esta forma, se evita recopilar grandes cantidades de datos sobre factores que no son realmente importantes, lo que permite ahorrar tiempo y recursos. Además, este diseño permite centrarse en aquellos factores que son realmente relevantes, lo que facilita la interpretación de los resultados obtenidos (96).

4.2 Método Taguchi

El método de Taguchi es una herramienta para la evaluación del desempeño que se emplea para el diseño de un experimento mediante la simulación de las diferentes condiciones de una experimentación (97). Se toma en cuenta que la variación funcional en el desempeño, a su vez esta influenciada por factores de ruido, que varían en el ambiente en el que el experimento está funcionando. El modelo Taguchi se enfoca en minimizar el impacto de estos factores sin importancia estadística, de forma que se puede obtener un resultado más consistente y predecible, lo que lo hace una herramienta de gran utilidad para mejorar la fiabilidad de procesos (97).

4.3 Response surface methodology - RSM

La metodología de superficie de respuesta o RSM registra y examina las relaciones entre varias variables y uno o más niveles de respuesta. Se basa en el uso de diseños experimentales que permiten obtener información sobre la relación entre las variables de entrada y las de respuesta, y así lograr construir un modelo matemático que describa dicha relación. El modelo obtenido se utiliza para predecir el desempeño del proceso o producto en diferentes condiciones de operación, y para encontrar los valores óptimos de las variables de entrada que maximizan la respuesta. La idea principal es utilizar una secuencia de experimentos diseñados para obtener una respuesta óptima (98).

CAPÍTULO II

MATERIALES Y MÉTODOS

5. LOCALIZACIÓN Y MATERIAL DE EXPERIMENTACIÓN

5.1 Lugar de ejecución

Esta tesis se llevó a cabo en el laboratorio de biotecnología del vicerrectorado de investigación E - 406 en la Universidad Católica de Santa María - Arequipa, Perú, durante los años 2022 y 2023.

5.2 Material

5.2.1 Material biológico

- Cepa de *Haematococcus pluvialis* en medio líquido BBM.
- Biomasa liofilizada de *Haematococcus sp.*

5.2.2 Material de vidrio y plástico

- Tubos falcón de 15 y 50 mL
- Tubos de ensayo de 5 mL
- Tubos de muestra de 1.5 y 2 mL
- Probetas de 250, 500 y 1000 mL
- Botellas de 250, 600 y 1000 mL
- Matraces de 125 mL
- Vidrios de reloj de 10 y 20 cm
- Pipetas graduadas de 1, 2, 5 y 10 mL
- Beakers de 100, 250 y 400 mL

- Viales de vidrio de 5 mL
- Placas para inmunoensayos de 96 pocillos
- Celdas de cuarzo y plástico para espectrofotometría
- Columna para NMR (Sigma-Aldrich)

5.2.3 Reactivos

- Etanol grado 96° (LabKem)
- Acetona grado técnico (Merck Milipore)
- Cloroformo al 99.5 % (Merck Milipore)
- Cloroformo deuterado 99.8 % grado RMN CDCl₃ (Scharlab)
- Tetrametil acilar o Tetrametil-1,3-fenilendiamina (CTR Scientific)
- Hexano al 99% (Merck Milipore)
- Metanol (Merck Milipore)
- Cloruro de Sodio (J.T.Baker)
- Fosfato de Potasio Monobásico (Merck Milipore)
- Fosfato de Potasio Dibásico (J.T.Baker)
- Hidróxido de Potasio (MEYER)
- Ácido Sulfúrico (Biopack)
- Sulfato Ferroso Heptahidratado (J.T.Baker)
- Nitrato de Cobalto (J.T.Baker)
- Molibdato de Sodio (MEYER)
- Cloruro de Calcio Dihidratado (Sigma-Aldrich)
- Sulfato de Zinc y de Cobre (Merck Milipore)
- Agar – Agar (Merck Milipore)

5.2.4 Instrumentos y aparatos

- Micropipetas automáticas de 2-20, 50-200 y 100-1000 μ l (Topscien)
- Micropipeta multicanal 200 μ l de 8 terminales (Thermo Scientific)
- Placas recubiertas para TLC (Sigma-Aldrich)
- Placa de vidrio recubierta de sílica para CP (Sigma-Aldrich)
- Bombas de aire SB-108 (SOBO)
- Luces LED de 5 metros con intensidad de luz a control manual 30-110 lm / W (i-Lumina)
- pHmetro digital (EZODO)
- Agitadores magnéticos

5.2.5 Equipos

- Balanza analítica (WELLiSH)
- Incubadora digital de 65L (Faithful)
- Campana de flujo laminar (BIOBASE)
- Agitador orbital - Shaker de 100 a 800 rpm
- Microscopio óptico digital de 10 X a 100 X
- Microscopio invertido de contra fase de 40 X a 1500 X
- Equipo de resonancia magnética nuclear 80 MHz (Spinsolve)
- Centrifuga con adaptadores para tubos de 15 y 50 mL
- Hot plate agitador análogo 110 V
- Espectrofotómetro UV-Vis digital (Thermo scientific)
- Autoclave
- Lector de placas de inmunoensayos UV y software

6. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

6.1 Selección y recepción de la cepa

La cepa *Haematococcus sp.* se obtuvo del laboratorio de investigación del vicerrectorado de investigación de la universidad Católica de Santa María; la descripción de la cepa se encuentra en la tesis denominada: “Determinación de las condiciones de cultivo, producción, extracción y análisis de astaxantina producida a partir de una cepa nativa de la microalga *Haematococcus lacustris*” en la que se caracterizó molecularmente como *Haematococcus sp.*, que fue recolectada de cuerpos naturales de agua en, Ica-Perú.

La cepa fue guardada por 3 años, en medio líquido BBM, antes de ser activada de nuevo en el 2021 lo que la hizo propensa a contaminación por hongos y diferentes microalgas.

6.2 Eliminación de contaminantes microbianos de *Haematococcus sp.*

6.2.1 Método de aislamiento por centrifugación

La cepa de *Haematococcus sp.* contaminada con hongos, se cultivó en un matraz Erlenmeyer de 100 mL con 50 mL de medio BBM modificado, la composición se describe en la tabla (*Anexo 1*), el cultivo líquido se colocó en un agitador orbital a 160 rpm.

Una vez el nivel de biomasa algal sedimentado es igual al nivel del medio de cultivo, se separó en 4 tubos falcón de 15 mL para centrifugar a 2500 rpm por 5 minutos, este método sirve para romper las hifas y deconstruye las columnelas matando el hongo (99).

6.2.2 Método de aislamiento en placa con medio restringido

Para aislar las *Haematococcus sp.* de la microalga contaminante, que se encontró y posteriormente identificó microscópicamente como *Scenedesmus sp.*, se preparó un litro de medio BBM completo con 17 g de agar y un litro de BBM modificado con restricción de nitrógeno, fósforo y 17 g de agar, se autoclavó por 15 minutos a 120 °C y 15 libras, posteriormente los medios se

plaquearon en una cámara de flujo laminar para evitar contaminación, se dejó gelificar con la cámara cerrada, a temperatura ambiente por 30 minutos, antes de sembrar se hizo una desinfección con UV por 10 minutos.

El método de aislamiento consiste en, facilitar la identificación de *Haematococcus sp.* en placa, debido a que el medio BBM se modifica con limitación de nitrógeno y fosforo, el crecimiento de colonias enquistadas es promovido, estas son de tonalidad rojo oscuro, lo que las hace fáciles de diferenciar entre resto de colonias.

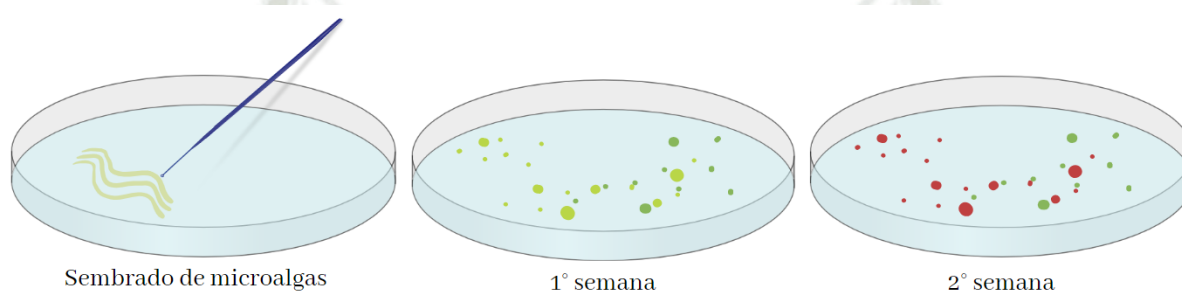


Figura 7. Método de aislamiento en placa con medio restringido.

Fuente: *Elaboración propia* (99,100).

Del cultivo líquido BBM con *Haematococcus sp.* se tomó una muestra de un mililitro que se usó para sembrar con asa de Kolla en las placas con medio restringido, las placas se sellaron con parafilm para evitar pérdida de humedad y se colocaron en vitrina con luz 12h por 2 semanas con monitoreo microscópico constante de crecimiento (100).

Una vez las cepas enquistadas de tono rojo se hicieron obvias a la vista se usó el microscopio de placa para tomar solo las cepas de *Haematococcus* en un asa de Kolla, las colonias rojas se sembraron en placas nuevas con medio BBM restringido para seguir con la purificación, el proceso se repitió una vez más. Finalmente se hizo observación microscópica para identificar las cepas rojas y se rasparon con asa para ser re-suspendidas en medio BBM líquido completo y sembrarlas en placas de BBM completo para su conservación en refrigeración.

6.2.3 Método de aislamiento por diluciones seriadas

Completado el método de aislamiento en placa se observó el cultivo en medio líquido, la acumulación de *Haematococcus sp.* era mucho mayor, sin embargo, aún se observaban *Scenedesmus sp.*, para esto se realizaron diluciones seriadas en placas de 96 pocillos para inmunoensayos que se redestinaron para realizar este método de aislamiento (101).

Para empezar, se cortó el empaque de la placa de inmunoensayos con cuidado de forma que pueda ser reintroducida de nuevo, se ajustó una pipeta multicanal a 40 μL y se pipeteó medio BBM para dispensar la placa de 96 pocillos de columna en columna, en una placa Petri se colocó 5 mL del cultivo de *Haematococcus sp.* para facilitar su absorción con la pipeta multicanal, esta se ajustó a 5 μL por canal y se tomó la muestra para re-suspender en la primera columna, se tomó 5 μL de la mezcla y se volvió a re-suspender en la siguiente y así sucesivamente, hasta la última columna los 5 μL de sobra, se desecharon.

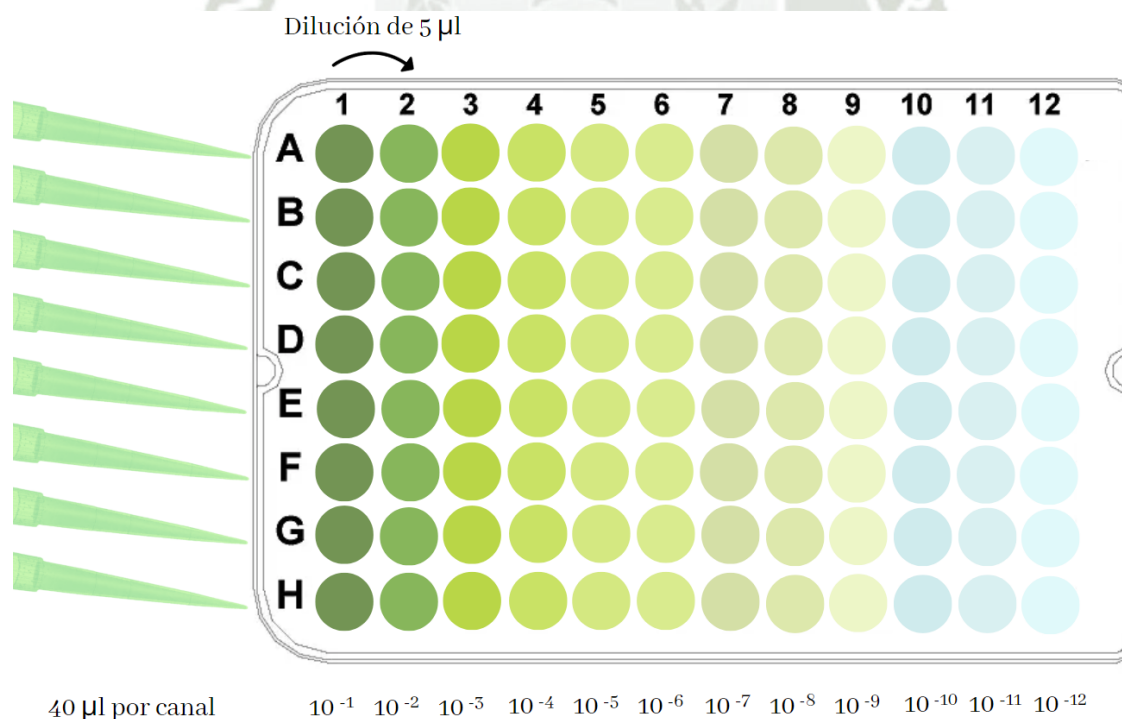


Figura 8. Método de aislamiento por diluciones seriadas.

Fuente: Elaboración propia (101).

Inmediatamente se cubrió la parte superior de placa con plastic wrap con cuidado de no tocar la parte inferior para no dejar huellas dactilares y se introdujo dentro de su empaque original para evitar evaporación del medio, se dejó a 21 °C con un fotoperiodo de 12 h de luz y 12 h de oscuridad, por 2 semanas para su proliferación con monitoreo cada 2 días.

Tan pronto como los pocillos tornaron a tonalidades de verde se llevó la placa al microscopio invertido para hacer la evaluación microscópica pocillo por pocillo, la evaluación se realizó con luz invertida verde en objetivo de 100 x, se tomó muestras de los pocillos en los que no se encontró contaminación por *Scenedesmus sp.*, se colocó en tubos falcón de 15mL con 5mL de medio BBM, se cubrió la tapa con plastic wrap y se dejó a 21 °C con fotoperiodo de 12 h de luz y 12 h de oscuridad, por 2 semanas agregando 1mL de medio completo BBM cada 3 días, en un agitador orbital a160 rpm (101).

6.3 Producción de biomasa de *Haematococcus sp.*

Se buscó producir biomasa suficiente, en estado vegetativo para ser expuesta a estrés salino y consecuentemente obtener biomasa enquistada de *Haematococcus sp.* la cual posteriormente se utilizó para la obtención de astaxantina.

6.3.1 Condiciones ambientales y selección del medio de cultivo

Para obtener una cantidad considerable de astaxantina se cultivó *Haematococcus sp.* en su estado vegetativo, para lo cual se usó el medio completo BBM, se comenzó inoculando la cepa en un matraz de 250 mL con 100 mL de medio BBM, se cubrió con plastic wrap y se dejó en agitación de 180 rpm con fotoperíodo de 12 h luz, 12 h oscuridad (76).

Para escalar la biomasa se esperó 14 – 20 días en los que se acumuló suficiente biomasa en el matraz de 250 mL, se distingue cuando se saca el cultivo de agitación y se lo deja a sedimentar por 15 minutos, si la biomasa forma una fase del mismo tamaño que el halo superior de medio sin biomasa, se puede proceder a escalar.

6.3.2 Escalamiento para acumulación de biomasa

Se tomó 50 mL del cultivo y se inoculó en una botella de 1 L con 500 mL de medio completo BBM. Se utilizó los mismos parámetros que en la fase anterior, luego se insertó al interior de la botella una manguera de 6mm de diámetro por un tapón de algodón envuelto en gasa y se conectó el otro extremo de la manguera a una bomba de aire para pasar burbujeo de 8 W de potencia al medio, por 2 semanas (74).

Este proceso se repitió en varias botellas de un litro para facilitar el burbujeo homogéneo, asegurar que las células reciban luz uniformemente (5).

6.4 Inducción de la cepa *Haematococcus sp.* para la producción de astaxantina

Para inducir las células de la microalga verde *Haematococcus sp.* a acumular el pigmento cetocarotenoide astaxantina se necesitaba alterar las estrictas condiciones en las que la cepa creció. Cambiar estas condiciones en la etapa de acumulación y crecimiento de biomasa sería desfavorable ya que sabe que el estrés ambiental o nutricional, interfiere con la división celular, desencadena la acumulación de astaxantina, que se da en un cambio de la etapa celular verde vegetativa biflagelada a células inmóviles y grandes en reposo (1,34).

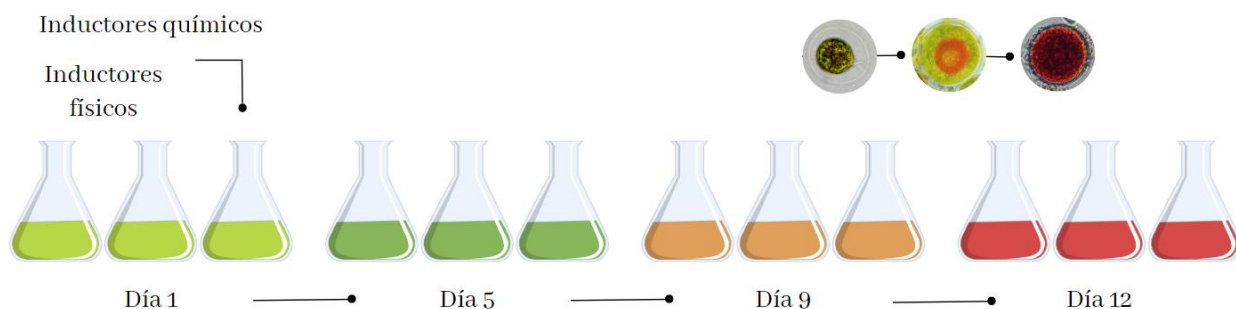


Figura 9. Inducción de la cepa *Haematococcus sp.* para la producción de astaxantina.

Fuente: Elaboración propia (102).

Se identificaron los mejores parámetros y compuestos para la inducción de astaxantina, se seleccionaron los más citados, se realizó un diseño de *Plackett - Burman* se describe en la tabla (*Anexo 2*), para tener combinación de las diferentes variables que se procedieron a comparar, para evaluar su efectividad (79).

Para esto el cultivo en medio BBM se dejó sedimentando por 24 h, se sacó la mitad del sobrenadante y se midió espectrofotométricamente a 560 nm para evaluar la densidad óptica del cultivo, se tomó el resultado de 0.500 y este se usó para reproducir la misma densidad en todas las muestras posteriores que se usaron para la repetición de este experimento (79,102).

6.4.1 Selección y optimización de inductores químicos

En primer lugar, se seleccionaron los inductores químicos más usados en la literatura y los que obtuvieron mejores resultados fueron; privación de nitrógeno en medio, ausencia de fósforo, aumento en el porcentaje de NaCl, adición de acetato (79,99,102,103).

Para evaluar el efecto de nitrógeno se preparó medio con ausencia de NaNO_3 , para fósforo se preparó medio sin las sales KH_2PO_4 y K_2HPO_4 , en el caso de NaCl la literatura sugiere exponer en % añadidos a medio completo BBM de 0.25, 0.45, 0.63 y 0.90 %, se tomó los porcentajes en comparación y se llegó a un punto medio de 0.5% de NaCl es decir para cada litro se añadió 5 gramos de NaCl, para el acetato investigaciones previas concuerdan y recomiendan su uso en un porcentaje de 0.2%, para lo que se usó 2g por litro de medio BBM (103). En 12 botellas de 250mL se preparó los 12 medios que se describen en la tabla (*Anexo 3*), para los 12 experimentos que a su vez se realizaron por duplicado en matraces de 250mL que se llenaron con 50mL de medio y 10 mL de biomasa.

6.4.2 Selección y optimización de inductores físicos

La selección de inductores físicos se realizó de la misma forma que los físicos, mediante revisión bibliográfica, los más citados son; fotoperiodos

extensos, temperaturas bajas y altas comprendidas entre 15 y 35 °C, diferentes intensidades luminosas en los rangos de luces LED que se comprenden entre 30 - 120 W y explosión a radiación UV por no más de 20 minutos a 30 - 50 cm (102).

Los 24 matraces para la experimentación se separaron cajas de 30x20x15cm que se usaron para evitar el intercambio de variables de iluminación, para evaluar el fotoperiodo las cajas se cubrieron con luces LED en cinta de 5 m por dentro y se conectaron a enchufes temporizadores programados en 24 y 12 horas, para la intensidad de luz se programó las cintas en modo multicolor con intensidades mínima de 30 W y máxima de 110 W (3).

Para estimar el efecto de la temperatura se usó un cuarto de refrigeración que se mantuvo a 17 °C y una incubadora programada a 34 °C, la exposición a radiación UV se llevó a cabo en una cámara de luz laminar, las muestras que requerían tratamiento de luz UV se llevaron a la cámara y se colocaron debajo del foco de luz ultravioleta todos los días de la experimentación por 15 minutos a una distancia de 40 cm.

6.4.3 Inducción de la biomasa para desencadenar la carotenogénesis

La biomasa se mezcló manualmente moviendo la botella circularmente creando un vórtice para distribuir la cepa en el medio de forma uniforme, esta se separó en 24 partes para inocular en matraces de 250mL que a la vez contenían 50mL de medio BBM con diferentes inductores químicos:

- Medio BBM con presencia y privación de NaNO_3 ,
- Medio BBM con presencia y privación de KH_2PO_4 y K_2HPO_4 ,
- Medio BBM con presencia NaCl y NaCl al 0.45%,
- Medio BBM sin Acetato y con Acetato de sodio al 0.5%.
-

Estas biomasas se a la vez se expusieron a los siguientes inductores físicos:

- Fotoperiodo por 24 y 12 horas,
- Temperatura de 17°C y 34°C,
- Intensidad de luz mínima de 30 Watts y máxima de 110 Watts,
- Exposición UV por 15 minutos a 40cm.

Los matraces se rotularon con los números asignados con el diseño *Plackett – Burman* y se colocaron en cajas que a la vez fueron rotuladas con las especificaciones de los matraces dentro de ellas, posteriormente se llevaron a la incubadora si necesitaban 34°C, al cuarto de refrigeración constante para las que tenían condición de 17°C durante 12 días.

6.5 Extracción y cuantificación de carotenoides totales

6.5.1 Tratamiento para la extracción de carotenoides de la biomasa

El tratamiento de la biomasa comenzó una vez pasados los 10 días de experimentación para la inducción de astaxantina, los 24 ensayos en los matraces se colocaron a temperatura ambiente para dejarlos sedimentar por 6 horas, terminado este periodo se retiró 10 mL de medio a cada uno con cuidado de no sacar biomasa (76,82).

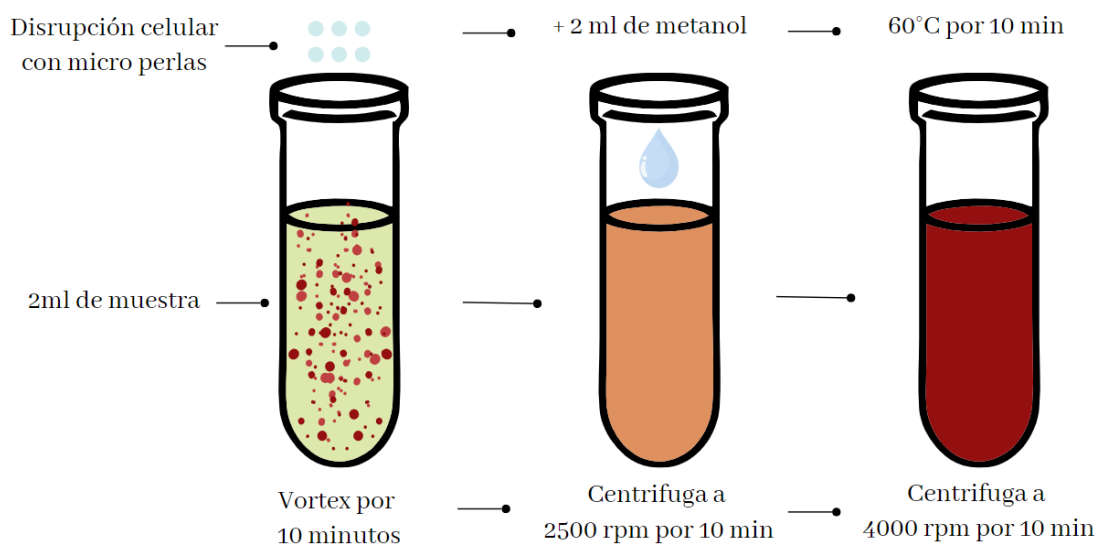


Figura 10. Tratamiento para la extracción de carotenoides de la biomasa de *Haematococcus sp.*

Fuente: *Elaboración propia* (104).

En tubos de 15mL se colocó 2mL de muestra uniformizada de cada matraz, para la disrupción celular se colocaron 6 micro perlas de vidrio por tubo y se vortexó por 10 minutos, una vez terminado se sacaron las 6 micro perlas con

ayuda de pinzas, los tubos se cerraron para llevar a la centrifuga a 2500 rpm por 10 minutos, el sobrenadante se descartó y se conservó la biomasa.

Para la solubilización de pigmentos se añadió 2 mL de metanol a cada tubo, se cerraron sin ajustar las tapas por completo, se llevaron a baño maría de 60°C por 10 minutos una vez terminado se secaron y se llevaron a la centrifuga a 4000 rpm por 10 minutos, el sobrenadante se recolecto en tubos Eppendorf de 2 mL rotulados con sus respectivos números de identificación.

6.5.2 Cuantificación espectrofotométrica de pigmentos

Los coeficientes de absorción específicos y longitudes de onda “Abs” han sido estimados, para carotenoides y clorofilas a-b, con ciertos disolventes; acetona, cloroformo, dimetilformamida, éter etílico, DMSO, etanol y metanol (104).

SOLVENTES	COEFICIENTES (C)								LONGITUD DE ONDA (ABs)		
	1	2	3	4	5	6	7	8	1	2	3
<i>Acetona 100%</i>	11.75	2.35	16.67	3.96	1000	2.27	81.4	227	470	645	662
<i>Acetona 80%</i>	12.21	2.81	20.13	5.03	1000	3.27	104	229	470	646	663
<i>Cloroformo</i>	10.91	1.2	16.38	4.57	1000	1.42	46.09	202	480	648	666
<i>Dimetilformamida</i>	11.65	2.69	20.81	4.53	1000	0.89	52.02	245	480	647	664
<i>DMSO</i>	12.19	3.45	21.99	5.32	1000	2.14	70.16	220	480	649	665
<i>Etér etílico</i>	10.05	0.766	16.37	3.14	1000	1.28	56.7	230	470	644	662
<i>Etanol</i>	13.95	6.88	24.96	7.32	1000	2.05	114.8	245	470	649	665
<i>Metanol</i>	15.65	7.34	27.05	22.21	1000	2.86	129.2	245	470	653	666

Tabla 3. Coeficientes de absorción específicos y longitudes de onda de diferentes solventes (104)

Los sobrenadantes recolectados se midieron en un espectrofotómetro a longitudes de onda de 470, 653 y 666 nm, para asegurar el menor porcentaje

de error posible se usó la misma cubeta de cuarzo, se enjuagó con alcohol al 96% después de cada muestra y se esperó a que se evaporara antes de colocar la siguiente muestra. La identificación de carotenoides totales se hizo con las siguientes formulas planteadas por *Lichtenthaler and Wellburn* incluidas las de clorofila ya que no se puede estimar los carotenoides sin las previas (104).

$$(1) \text{ Clorofila } a = ((C_1 \times Abs_3) - (C_2 \times Abs_2)) \left(\frac{U}{V}\right)$$

$$(2) \text{ Clorofila } b = ((C_3 \times Abs_2) - (C_4 \times Abs_3)) \left(\frac{U}{V}\right)$$

$$(3) \text{ Carotenoides totales} = \frac{(C_5 \times Abs_1) - (C_6 \times C_a) - (C_7 \times C_b)}{C_8} \left(\frac{U}{V}\right)$$

Ecuación 1. Ecuación de clorofila a de *Lichtenthaler and Wellburn*,

Ecuación 2. Ecuación de clorofila b de L & W,

Ecuación 3. Ecuación de carotenoides totales de L & W (104).

Estas ecuaciones correlacionan las clorofilas a y b con los carotenoides totales y el solvente utilizado, la cuantificación de las concentraciones de clorofila a, b y carotenoides se da en mg L⁻¹.

$$(4) \text{ Clorofila } a = (15.65 A_{666} - 7.34 A_{653}) \left(\frac{U}{V}\right)$$

$$(5) \text{ Clorofila } b = (27.05 A_{653} - 11.21 A_{666}) \left(\frac{U}{V}\right)$$

$$(6) \text{ Carotenoides totales} = \frac{(1000 A_{470} - 2.86 Ca - 129.2 Cb)}{245} \left(\frac{U}{V}\right)$$

Ecuación 4. Ecuación de clorofila a de L & W para metanol,

Ecuación 5. Ecuación de clorofila b de L & W para metanol,

Ecuación 6. Ecuación de carotenoides totales de L & W para metanol (104).

Se usó metanol como solvente y se completó las ecuaciones con los coeficientes y longitudes de onda correspondientes, en la ecuación: U es el volumen de metanol y V es el volumen de la muestra ambos en mililitros.

Se tomo nota de las lecturas de cada una de las muestras, se pasó a una hoja de Excel para dar solución a las ecuaciones y averiguar las variables que inducen la mayor producción de astaxantina (104,105).

Se seleccionaron las 5 variables más importantes: NaCl, nitrógeno, temperatura fosforo y tiempo, las variables químicas se evaluaron con la metodología de superficie de respuesta – *RSM* y las variables físicas con *Taguchi*.

6.6 Selección del mejor método de extracción de astaxantina

6.6.1 Preparación de la muestra

Para extraer la mayor cantidad de astaxantina de una muestra se recomienda hacerlo desde “dry biomass” ya que se llega a una acumulación de astaxantina del 4 % en biomasa seca. La muestra de 2 botellas de 1 L se sedimentó por 24 horas, se decantó en una botella el sobrenadante como cultivo ya que *Haematococcus sp.* jóvenes tienen flagelos y aquellos que no están enquistados pueden encontrarse en el sobrenadante, la biomasa aun con liquido se dejó sedimentando en la cámara de flujo laminar con UV por una hora, seguidamente ensamblamos el equipo de filtración al vacío y recolectamos la biomasa en papel filtro de filtración lenta (5).

Una vez terminada la filtración de toda la muestra se pasó a hojas de papel aluminio y se esparció lo más delgado posible para mejorar la evaporación uniforme del líquido aún en la biomasa, una vez concluida la evaporación se llevó a la estufa a 90 °C por 15 min y reservamos (1,70).

6.6.2 Evaluación de extracción con solventes

Según la bibliografía se pueden usar diferentes compuestos para la extracción de astaxantina de la microalga *Haematococcus sp.*, se sabe de extracción química basada en aceites y en solventes, con el uso de aceites se obtiene un porcentaje menor de astaxantina que al de usar solventes y no hay procesos extra de purificación de las trazas de óleos (106).

Para la evaluación del mejor solvente para la extracción se realizó un ensayo por triplicado de la capacidad de extracción de los solventes seleccionados: acetona, etanol, cloroformo y hexano. Primero se molió ávidamente 2 g de

biomasa seca en un mortero por 10 minutos hasta pulverizarla, luego se prepararon y rotularon 12 viales de 5 mL, se tomó 0.1 g de biomasa pulverizada y se añadió a cada vial, seguidamente se agregó 2mL de acetona, etanol, cloroformo, hexano según corresponda y se dejó reposando por un día. Pasadas las 24 h, sin agitar de cada vial se tomó muestras del 2mL y se colocaron tubos Eppendorf para centrifugar a 2500 rpm por 5 min, de tomó 1.5 mL del sobrenadante y se leyó en el espectrofotómetro a las longitudes de onda específicas para cada solvente *Tabla 3.* (105).

6.6.3 Evaluación de las variables que asisten a la extracción con solventes

Esta establecido que las variables físicas van de la mano con la extracción química, se tomó para evaluar las más importantes: temperatura, concentración y tiempo de contacto (89).

Antes de realizar la comparación de hizo una prueba de barrido para evaluar si el solvente usado tiene diferentes longitudes de onda a diferentes concentraciones, y justipreciar si la variable de concentración puede ser medida o no, para esto se colocó 2 mL de etanol al 48,72 y 96 % en cubetas de cuarzo, posteriormente se llevó al espectrofotómetro donde se hizo un barrido espectral (89).

Una vez decididas las 3 variables, se estableció los niveles, el tiempo de contacto del solvente con la biomasa es recomendable y más eficaz en un rango de 30 a 40 min, elevar la temperatura también es un factor que mejora la extracción, por otro lado el régimen no puede ser mayor de 60 °C para no desnaturalizar la molécula por la destrucción de los principales farmacólogos de la astaxantina, la temperatura recomendable oscila entre los 33 a 42 °C, la concentración del solvente juega un papel importante también ya que afecta la permeabilidad de la pared celular para dejar pasar la astaxantina al medio líquido, se sugiere una concentración de entre 60 y 80 % (9,89).

Para evaluar las variables de extracción se usó la técnica de superficie de respuesta para las 3 variables; tiempo, temperatura y concentración, que a su vez se evaluaron en 3 niveles diferentes; 20°, 35°, 50° C, 10, 35, 60 minutos

y 48, 72 y 96 %. Se comenzó moliendo 4 gramos de biomasa seca en el mortero hasta pulverizarla, seguidamente se tomaron 15 tubos de ensayo de 5mL con tapa para evitar evaporación del solvente y se rotularon con el número del ensayo, en cada uno se colocó 0.20 g de la biomasa pulverizada y se aumentó 4 mL de etanol en la concentración que corresponde y se expuso a las diferentes temperaturas con el equipo de baño maría para las temperaturas de 35 y 50 °C y para la de 20 °C se dejó las muestras en un cuarto de temperatura regulable a 20 °C por los tiempos respectivos.

Una vez concluidos los ensayos de las variables, se colocó las muestras en tubos falcón y se llevó a centrifugar a 2500 rpm por 5 minutos, de cada muestra se tomó 2 mL y se evaluó en el espectrofotómetro en las lecturas de 470, 653 y 666 nm (105).

6.7 Separación e identificación de astaxantina

6.7.1 Evaluación de solventes para la fase móvil de cromatografía en capa fina del extracto de Haematococcus sp.

Para la selección de la fase móvil se tomó en cuenta los componentes específicos del extracto que se está evaluando, puesto que de esto depende la afinidad de los solventes (107). Las fases móviles comúnmente usadas son: hexano, acetona, benceno y cloroformo, o sus mezclas en diferentes proporciones, para la preparación de la muestra, se molió 2 g de biomasa seca, en un mortero por 5 minutos hasta pulverizarla, se añadió 5 mL de etanol y se colocó en un tubo falcón, esta mezcla se llevó al shaker a 200 rpm el tubo se colocó horizontalmente para lograr que el solvente llegue a todas las partículas de la biomasa y se dejó en movimiento por 2 horas, una vez concluido es te tiempo, se centrifugó a 2500 rpm por 5 min y se reservó el sobrenadante en un tubo falcón (107).

Para la evaluación de los solventes se prepararon 4 vasos de precipitados de 100 mL y 4 vidrios de reloj que cubran la parte superior de los Beakers para recrear una cámara cromatográfica, en cada uno se colocó 2 mL de cada

solvente y se cubrieron por 15 minutos para saturar el ambiente dentro de la cámara. Para medir el desplazamiento de los componentes en el extracto se cortaron 4 placas del mismo tamaño y se trazó una línea a medio centímetro de la base, con ayuda de un tubo capilar se tomó una gota de la muestra y se sembró encima de la línea trazada en cada una de las placas, todas se colocaron dentro de las cámaras con pinzas y se dejó corriendo la muestra hasta que el solvente llega al tope de la placa. Las placas se sacaron de las cámaras y se dejaron secar a corriente de aire (89).

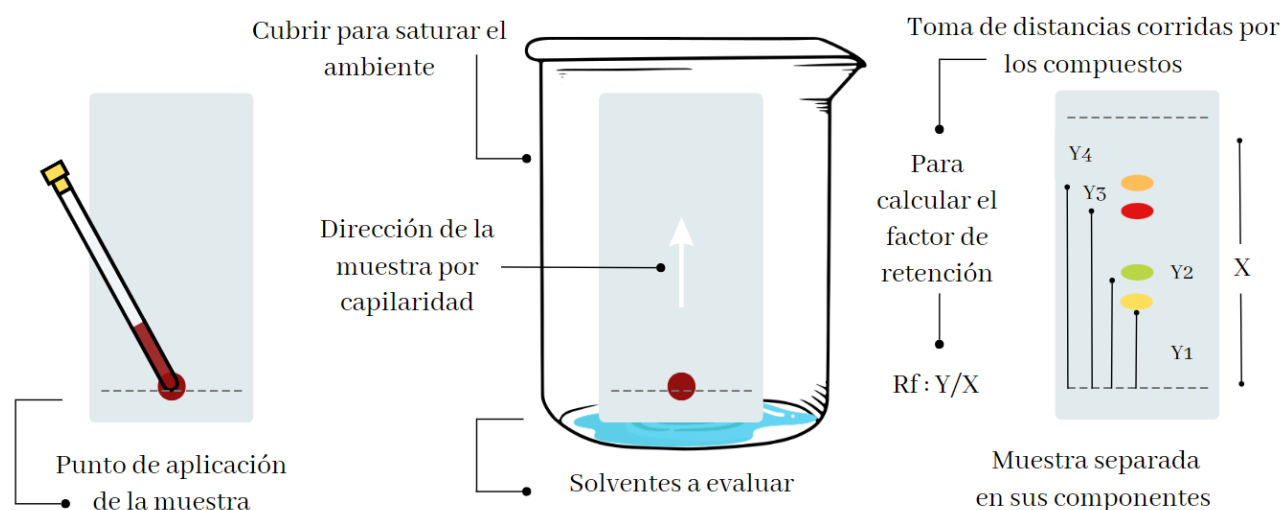


Figura 11. *Pasos para la evaluación del extracto en cromatografía capa fina oTLC.*

Fuente: *Elaboración propia* (107).

6.7.2 Selección de la fase móvil idónea para la separación de pigmentos

Para realizar la selección se tomaron la distancia que alcanza desde la línea dibujada hasta el límite del recorrido de la sustancia y se estandarizó el Rf. También se tomó la velocidad en la que el solvente desplazó la muestra (93). La determinación del Rf o factor de retención se puede explicar en base a la interacción entre las sustancias a separar y la fase móvil, esta se halló tomando como primer dato la distancia recorrida que se midió desde el centro de la mancha inicial hasta el tope de su migración “Y”, luego se midió la

distancia de recorrido disponible que es desde la línea trazada a medio centímetro de la base de la placa y la línea paralela a medio centímetro del otro extremo “X”, finalmente, para hallar el Rf se ejecutó la siguiente ecuación:

$$R_f = \frac{Y}{X}$$

Ecuación 7. Ecuación para calcular el factor de retención (89).

6.7.3 Evaluación de mezcla de solventes para obtener una fase móvil ideal con cromatografía en capa fina bidimensional

Una vez identificados los dos solventes que muestran mayor polaridad con las sustancias de la muestra se evaluaron en conjunto a diferentes proporciones para seleccionar la fase móvil idónea con ayuda de la técnica de cromatografía en capa fina bidimensional. Para su ejecución se preparó 3 cámaras con 2 mL de acetona, 2 mL de hexano y 2 mL de cloroformo respectivamente, se dibujó unas líneas paralelas a medio centímetro de todos los extremos de las placas cortadas en forma cuadrangular (92).

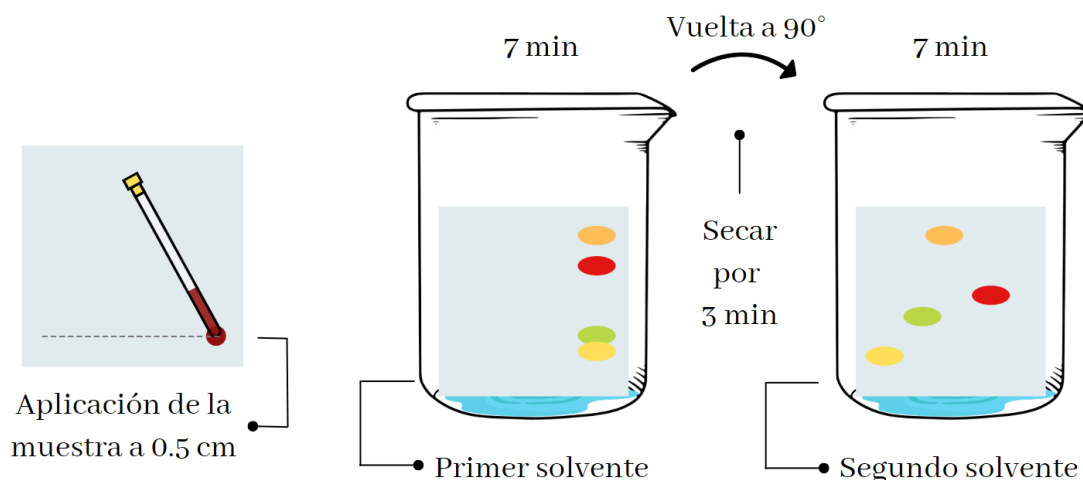


Figura 12. Pasos para una evaluación de cromatografía en capa fina bidimensional.

Fuente: *Elaboración propia* (92).

Se sembró una gota de muestra de extracto en la esquina izquierda de cada placa, para la primera dimensión se colocaron las placas con la esquina de la muestra en contacto con la fase móvil inicial, se dejó desplazar por 7 minutos, las placas se sacaron y se dejaron secar por 3 minutos, concluidos estos las placas se giraron en 90 grados y se insertaron en las segundas fases móviles a evaluar; hexano y cloroformo. Las placas se sacaron después de 5 minutos, se visualizaron y compararon las manchas de astaxantina, se dejaron secar para evaluar el mejor dúo de solventes para la fase móvil (92).

Para calcular los factores de retención de cada componente en ambas dimensiones, se midió la distancia recorrida por el pigmento desde el punto inicial de la muestra hasta el centro del punto, luego se dividió esta distancia entre la distancia total recorrida por la fase móvil, el RF se expresó como un porcentaje y se analizó (92).

6.7.4 Selección de los porcentajes de solventes para la fase móvil idónea

Para elegir los porcentajes de los 2 solventes seleccionados se preparó una cámara con 2 y 8 mL de acetona / hexano y otra con 3 y 9 mL de acetona / hexano respectivamente para formar soluciones de 1:4 y 1:3, recomendados por la literatura, se siguió el mismo procedimiento de cromatografía en capa fina y se analizaron los desplazamientos para elegir las concentraciones ideales (107,108).

6.8 Purificación de astaxantina del extracto de *Haematococcus sp.*

6.8.1 Separación de los pigmentos en el extracto crudo con cromatografía preparativa - CPrep

Esta cromatografía es similar a la de capa fina, la muestra se separa por la afinidad relativa de los compuestos que la conforman por las fases estacionaria en este caso la placa de vidrio recubierta por una capa gruesa de sílica y la móvil compuesta de 25 mL acetona y 75 mL hexano, en proporciones de 1:3 (93).

Se molió 3 g de biomasa seca, se colocó en un flacón de 15 mL y se añadió 5 mL de alcohol se dejó horizontalmente en el Shaker por 2 horas, seguidamente se llevó a la centrifuga a 2500 rpm por 5 minutos y el sobrenadante se recuperó en otro tubo falcón, se reservó en el refrigerador hasta su uso (91).

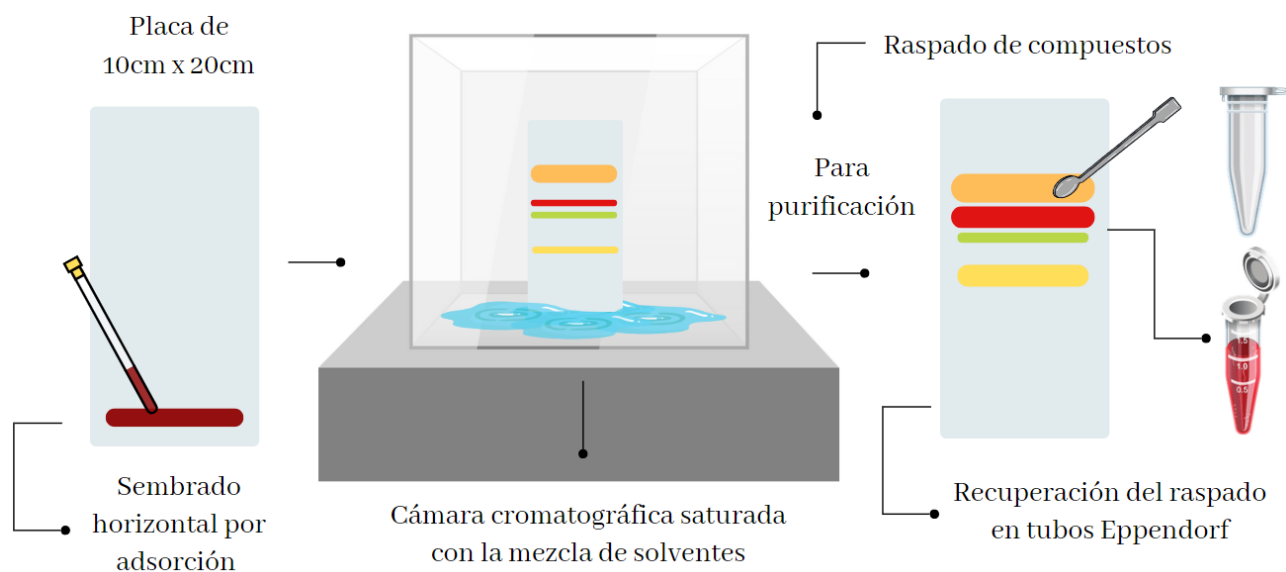


Figura 13. Metodología para separación de pigmentos en cromatografía preparativa.

Fuente: *Elaboración propia* (109).

La cromatografía utiliza una cámara cromatográfica que en este caso es de 30 x 40 cm lo que requiere un mayor cantidad y tiempo de exposición de la fase móvil en la cámara para la saturación total, se midió 25 mL acetona y 75 mL hexano en una probeta de 100 mL, se añadió a la cámara, antes de cerrarla se colocó un pedazo de papel filtro cortado en las mismas dimensiones que la placa, se colocó de forma vertical con un extremo tocando la fase móvil y el otro contra la pared y se cerró herméticamente por 45 minutos (89,107).

En el tiempo que toma la saturación de la cámara se preparó la muestra, para lo cual se trazó una línea con lápiz a un centímetro de la base para colocar la muestra, se sacó el extracto del refrigerador y con ayuda de un tubo capilar se fue tomando muestra y sembrándola sobre la línea trazada, la capa de sílica

es bastante gruesa, absorbe los 5mL de extracto en una longitud de 5x1cm, una vez terminada la siembra, se abrió la cámara y la placa se colocó encima por el lado del vidrio del papel filtro ya empapado de la fase móvil lo que facilita el desplazamiento de la mezcla de solventes (110).

La CPrep se dejó corriendo por un aproximado de 8 h consecutivas, se tomó evidencia fotográfica para medir la migración de compuestos, cuando se observó que los pigmentos no mostraron más desplazamiento a las 7 horas se dejó por una hora más para asegurar la máxima pureza de las diferentes sustancias ya que, aunque no hay cambios a simple vista los compuestos continúan separándose y concentrándose en una altura por la afinidad (109). La placa se sacó de la cámara cromatográfica y se dejó secando a corriente de aire y se dejó secando por 30 minutos.

6.8.2 Extracción y purificación de astaxantina del ensayo CPrep

Para la extracción de astaxantina, esta se identificó en la placa preparativa, por evaluación visual de color y seguidamente por comparación de los valores R_f , una vez delimitada el área que contenía la astaxantina, la placa se colocó encima de una hoja de aluminio para recolectar las partículas, y seguidamente, con ayuda de una espátula plana de acero de 200mm con mucho cuidado se fue raspando la sílica roja de la placa con mucho cuidado de no llevar a raspar el vidrio, se dio agitó ligeramente sobre la hoja de papel aluminio donde se recolectaron las partículas y gránulos para pasarlas a un tubo de reacción de 2mL (107).

Una vez obtenido el raspado se necesita separar la astaxantina de la fase estacionaria, para la purificación de astaxantina de la sílica que la contiene se realizó una extracción con etanol al 96%, el raspado se pasó del tubo de reacción a un tubo falcón de 15 mL, que se llenó con 5 mL de etanol, se agitó por 5 min y se llevó al shaker a 200 rpm por 2 h, seguidamente el tubo se llevó a centrifugar por 5 min a 2500 rpm, el sobrenadante se recolectó en dos tubos Eppendorf de 2 mL y se dejaron en una incubadora a 30 °C por 5 h hasta evaporar el etanol por completo (109).

6.9 Evaluación de astaxantina purificada

6.9.1 Identificación por barrido espectral de UV-Visible

Para realizar la identificación se tomó el tubo Eppendorf con la muestra de astaxantina y se re suspendió con 1mL de etanol 96°, hasta tener una mezcla homogénea. Una vez la astaxantina se disuelva por completo se carga el primer pocillo una placa de inmunoensayos con el solvente para calibrar el equipo antes de comenzar, para asegurar precisión y exactitud (90).

Seguidamente se selecciona el rango del barrido espectral que va de 380 a 780 nm, luego se cargó el segundo pocillo con la dilución de astaxantina y se midió. Al analizar el espectro resultante, se buscó la presencia de una banda de absorción en el rango de 470-480 nm, lo que indicaría la presencia de astaxantina en la muestra (84).

6.9.2 Resonancia magnética nuclear RMN

I. Preparación y corrida de muestra en resonancia magnética nuclear

La obtención de un espectro de RMN de alta resolución depende de una preparación de muestra adecuada, elección del disolvente correcto, cantidad suficiente de muestra y columna de dimensiones correctas, se seleccionó un disolvente con baja viscosidad, excelente pureza química y completamente deuterado y así minimizar la interferencia de señales de protones no deseados en el espectro, los más recomendados teóricamente son: el cloroformo-d CDCl_3 , el deutóxido de sodio D_2O , la acetona- d_6 y el dimetilsulfóxido- d_6 DMSO-d_6 (95).

Culminada la extracción, y evaporado el etanol de la muestra pura de astaxantina, se llenaron los tubos Eppendorf con 2mL de cloroformo-d cada uno y se agitó hasta disolver la astaxantina pegada a las paredes, con una micropipeta se pasó la muestra diluida en el solvente a un tubo de vidrio de 5mL para homogeneizar ambas mezclas (94,95).



Figura 14. Lectura de muestra de astaxantina en un equipo de resonancia magnética nuclear.

Fuente: *Elaboración propia* (95).

Para correr la muestra en el equipo de RMN hay que calibrarlo, para esto se usa tetrametil acilar o tetrametil-1,3-fenilendiamina por su cualidad de aceptar electrones ayuda a mejorar la calidad del espectro de la resonancia permitiendo mejor resolución, minimizando interferencia de señales de fondo y calibrado los desplazamientos químicos, para calibrar el equipo se llenó una columna de RMN con 2mL de tetrametil acilar y se corrió en el equipo de resonancia, una vez terminada la corrida el tetrametil acilar se desechó, para llenar la columna con la muestra de astaxantina diluida en cloroformo deuterado.

La columna se colocó en el porta muestras del equipo, seguidamente se prendió el software de la máquina para crear un nuevo experimento, se configuró los parámetros de experimentales de tiempo de adquisición y frecuencia de resonancia, se inició el experimento y se corrió la muestra por 10 horas para obtener una lectura con la menor cantidad de ruido, la lectura se guardó para su análisis en un software de procesamiento RMN (94).

El espectro de RMN se registró en el espectrofotómetro Spinsolve Carbon 80, que funciona a temperatura ambiente y 80 MHz, ideal para detectar compuestos en concentraciones sub-milimolares.

II. Evaluación y análisis del espectro RMN con Mnova 1D NMR

Se usó el software Mnova 1D NMR para analizar el espectro de astaxantina, se comenzó abriendo el espectro en el programa, mandando el comando para realizar el procesamiento, una vez terminado se asignó picos para ir identificando las señales y asignando grupos químicos correspondientes. Para analizar las señales de acoplamiento se evaluó la distancia entre los picos con las tablas de desplazamiento químico de protones y grupos funcionales (*Anexo 4*), para determinar la estructura de la molécula, a la vez se usó información de la estructura molécula de la astaxantina para comparar e identificar (94).

También se hizo uso del software ChemNMR para realizar una estimación, se realizó antes de llevar a cabo el experimento de resonancia magnética nuclear química para predecir el espectro de resonancia magnética nuclear de protones (^1H) del compuesto basado en su estructura química, esta estimación ayudó a obtener información sobre las señales de RMN esperadas, sus correspondientes desplazamientos químicos, interpretación y análisis de los espectros de RMN experimentales. Al ingresar al software se dibujó la molécula o estructura, y se corrió el programa para obtener un espectro de RMN interactivo o un espectro calculado que proporcionó información sobre los desplazamientos químicos esperados y las intensidades de los picos (111).

CAPÍTULO III

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

7. AISLAMIENTO DE HAEMATOCOCCUS SP.

7.1 Método de aislamiento por centrifugación

La cepa fue cultivada por 15 días en 50 mL de medio BBM en agitación para la proliferación de células y acumulación de biomasa pasados los días se observó crecimiento vegetativo visible por el color verde oscuro intenso del medio. En la primera evaluación microscópica *Figura 15. (A)*, el cultivo se encontraba opaco por la contaminación con una microalga diferente y hongo identificado morfológicamente por tal cual como describe Laezza. C et al. (99), para contrarrestar el crecimiento fungal se separó los 50 mL en tubos falcón para centrifugar, culminada, el medio en los tubos se observó menos opaco, este se pasó a un matraz en el que se dejó en agitación de 120rpm, al día siguiente, se evaluó microscópicamente por segunda vez, después de la observación de muestras del fondo del matraz, el medio y la superficie, los resultados de esta técnica concuerdan con los de Laezza. C et al. (99) ya que se puede afirmar que este método fue efectivo en romper las hifas y deconstruir las columnelas matando el hongo, se observó *Figura 15. (B)*, transparencia, hifas rotas y células *Haematococcus* liberadas de las columnelas enredadas.

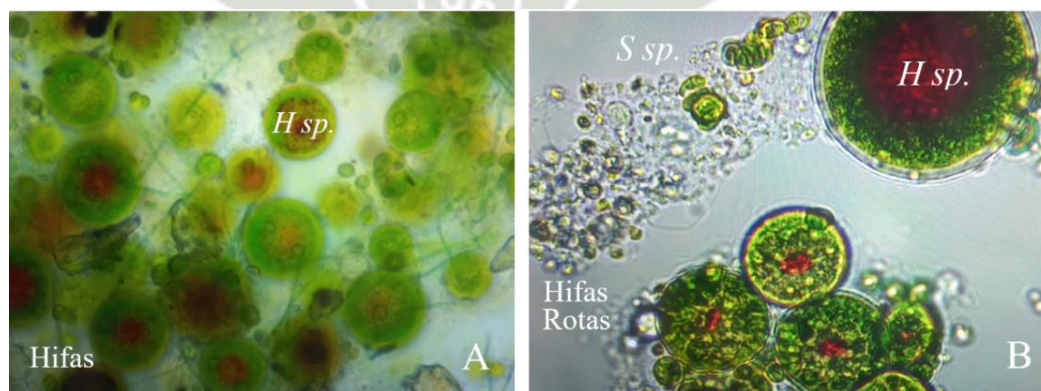


Figura 15. (A) Primera evaluación antes del método de centrifugación,
(B) Segunda evaluación microscópica después del método de centrifugación.

7.2 Método de aislamiento en placa con medio restringido

Desde que se cultivó la cepa para su proliferación se observó la presencia de una microalga diferente a *Haematococcus sp.*, microscópicamente identificada como *Scenedesmus sp.*, para lo que sembró el cultivo en medio BBM sólido con una modificación de restricción de nitrógeno y fósforo lo que facilitó la diferenciación entre las diferentes cepas ya que después de 2 semanas se observó crecimiento de cepas rojas y verdes, las células *Haematococcus sp.* se tornan rojas cuando su ambiente no es favorable y la restricción de sales importantes causa la producción de astaxantina, estas cepas fueron tomadas y trasladadas a otra placa para su purificación.

Dos semanas después de realizar la primera purificación se tomó una muestra de las cepas rojas que crecieron en placa y se observó que células de *Scenedesmus sp.* aun persistían junto con las células de *Haematococcus sp.* así que se optó por realizar el mismo procedimiento una segunda vez *Figura 16.*, luego de 2 semanas de realizar la segunda purificación en placa, se realizó otra evaluación microscópica de las cepas tomadas para inocular en medio y ya no se observó una gran cantidad de células contaminantes pero en una evaluación con más detenimiento a 100 X se vio que persistían algunas entre las células de *Haematococcus sp.*

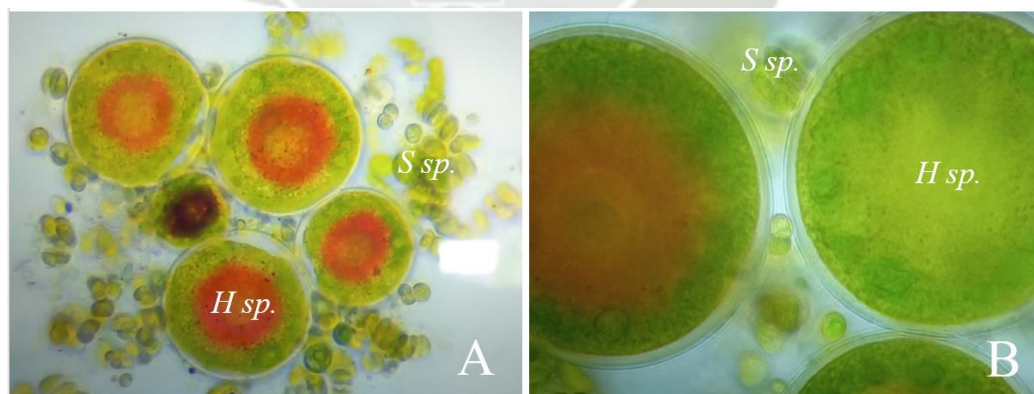


Figura 16. (A) Resultados de la primera purificación en placa, aun se observa muchas células *Scenedesmus sp.* (B) Resultados de la segunda purificación en placa, ya no se ven células contaminantes en el medio, pero aún persisten entre las células de *Haematococcus sp.*

7.3 Método de aislamiento por diluciones seriadas

Para purificar la cepa por completo, se aprovechó que las células de la contaminación *Scenedesmus sp.* eran mucho menos en comparación con las *Haematococcus sp.* y se usó la técnica de diluciones para aislarla usando una variación de la técnica de Allen. M et al. (101), no se usaron tubos, sino una placa de inmunoensayos de 96 pocillos.

Para esto se usó una placa de inmunoensayos en la que se diluyó medio con cultivo con medio completo BBM, se observó después de 2 semanas una vez el medio en los pocillos viro a tonalidades de verde *Figura 17.*, en un microscopio invertido los pocillos con mayor acumulación de células grandes (*Haematococcus sp.*) y posteriormente se tomó muestras de estos pocillos para observar en el microscopio óptico, de estas se seleccionó las limpias de contaminación *Figura 17.* y se sembraron en medio BBM completo para proliferar y acumular biomasa.



Figura 17. (A) Diluciones seriadas. (B) Resultados de la técnica.

8. PRODUCCIÓN DE BIOMASA

8.1 Selección de condiciones ambientales y del medio de cultivo

Después de las técnicas de aislamiento para purificar la cepa, el cultivo se encontraba con una baja concentración de células viables y muchas células deshidratadas con flagelos rotos, para asegurar la proliferación de las células se seleccionó las condiciones ambientales con mejores resultados en investigaciones (112), dirigidas a producción de biomasa de *Haematococcus sp.*, con fotoperíodo

de 12h luz, 12h oscuridad, agitación de 180 rpm y el medio de cultivo completo Bold's Basal (BBM). Estas condiciones probaron ser muy eficaces para la recuperación de las células y la proliferación vegetativa de *Haematococcus sp.*, después de una semana se observó que las células aumentaban en su diámetro y sus paredes celulares era visiblemente más gruesas.

8.2 Escalamiento para acumulación de biomasa

Para la acumulación de biomasa suficiente para correr los experimentos que son parte de la inducción de la cepa, se necesita escalar y una vez el cultivo se recuperó, las células empezaron a proliferar y el cultivo se tornó verde se inoculó en una botella de 1 L, se dejó en las mismas condiciones seleccionadas: agitación de 180 rpm con fotoperíodo de 12h luz, 12h oscuridad por 2 días, luego se insertó al interior de la botella una maguera de para pasar burbujeo según Harker, M et al. esto facilita la transferencia de biomasa eficientemente, promueve la interacción de células, oxigena el medio y mejora la frecuencia del ciclo de luz y oscuridad de las células de algas para su cultivo eficiente (74).

Este proceso se repitió en varias botellas de un litro para facilitar el burbujeo homogéneo, asegurar que las células reciban luz uniformemente y conservar las variables químicas como cambios de pH y concentración de sales lo menos mutables posible, *Figura 18.* después de 15 días la biomasa aumento exponencialmente evidenciada por la turbidez verde intensa, y en las muestras microscópicas.

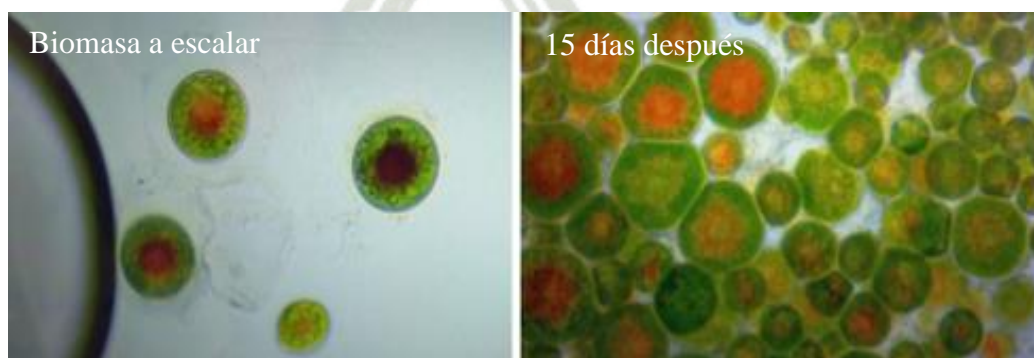


Figura 18. Antes y después del escalamiento de biomasa de *Haematococcus sp.*

9. IDENTIFICACIÓN DE PARÁMETROS Y COMPUESTOS PARA DESENCADENAR LA CAROTENOGÉNESIS EN *HAEMATOCOCCUS SP.*

La carotenogénesis del cultivo de *Haematococcus sp.* se indujo por estrés químico y físico según la *Tabla 4*. se seleccionaron los 8 factores inductores con mejores resultados según fuentes documentales (7,73,74,82), y estos se midieron en 2 niveles máximo (+) y mínimo (-), se corrió el diseño de Plackett-Burman en el programa Minitab y generó 12 experimentos que se realizaron por duplicado, dos veces.

<i>TEMPERATURA</i>	17°	Min (-)	<i>NITRÓGENO</i>	0	Min (-)
	34°	Max (+)		25g per 1l	Max (+)
<i>UV</i>	0	Min (-)	<i>FÓSFORO</i>	0	Min (-)
	15 min a 40cm	Max (+)		25g per 1l	Max (+)
<i>INTENSIDAD</i>	30 watts	Min (-)	<i>ACETATO</i>	0	Min (-)
	120 watts	Max (+)		2g per 1l	Max (+)
<i>TIEMPO</i>	12 h	Min (-)	<i>NACL</i>	0	Min (-)
	24 h	Max (+)		5g per 1l	Max (+)

Tabla 4. Variables y niveles para la inducción de la carotenogénesis.

Para la evaluación de las variables más efectivas en la inducción de astaxantina, se evaluó el contenido de pigmentos a los 12 días de exponer a los cultivos a todas las condiciones según el diseño experimental.

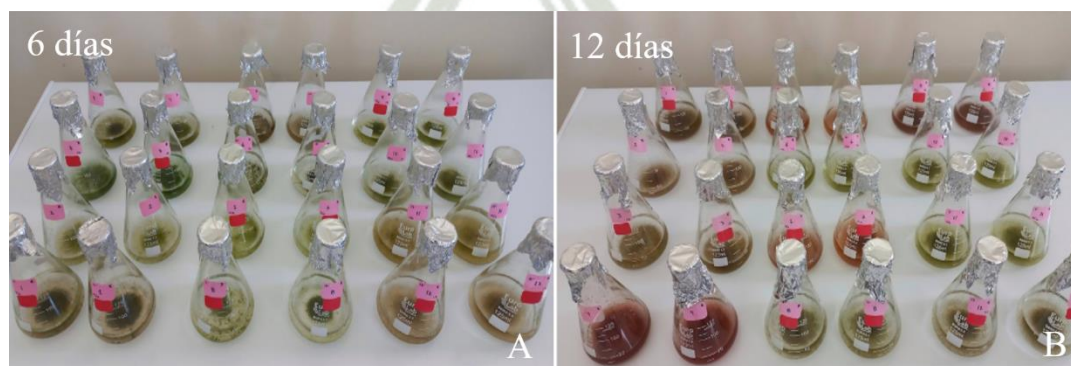


Figura 19. (A) Biomasa a los seis días (B) Biomasa a los doce días.

Si bien todas las variables son efectivas en inducir la cepa ya que se obtuvo biomasa enquistada en diferentes porcentajes en todas las experimentaciones, no es posible determinar a simple vista cuál de ellas tiene una mayor acumulación de astaxantina. Por lo tanto, se llevó a cabo una extracción de pigmentos para evaluar espectrofotométricamente y luego calcular matemáticamente la concentración real de los carotenoides en cada matraz de experimentación.

10. EXTRACCIÓN DE CAROTENOIDES TOTALES

10.1 Tratamiento para la extracción de carotenoides de la biomasa

Los métodos usados para la extracción se seleccionaron a partir de investigación bibliográfica, las técnicas más exploradas y que reportan mejores resultados, los pasos principales en toda extracción de pigmentos en células vegetales son: disrupción de la pared celular, solubilización de pigmentos y recuperación de pigmentos (106).

La disrupción celular es el primero de los pasos para maximizar la obtención de extracto, la técnica a usar depende de la permeabilidad las células de *Haematococcus sp.* tienen una pared celular robusta resistente no hidrolizable (7), la disrupción más efectiva para esta cepa es por fricción o abrasión, se prueba esto en el método usado, con vortexeo y perlas de vidrio, los 10 minutos de disrupción rompieron perfectamente la pared celular liberando los pigmentos de la pared celular, se vio evidenciado en evaluación microscópica después de tomar 0,5 μ L para observar de la muestra que se había vortexeado por un minuto, luego por la mitad del tiempo indicado y una última al finalizar el tratamiento de disrupción.

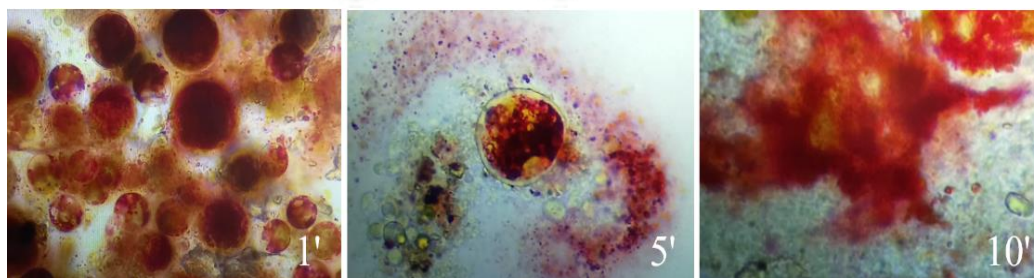


Figura 20. Tratamiento de disrupción, minuto 1, 5 y 10.

Para la solubilización de los pigmentos liberados de la pared celular, se usó la técnica de Linchtenthaler and Wellburn (104), la que precisa el uso de cualquiera de los solventes con coeficientes de absorción espectrofotométrica específica visibles en la *Tabla 3.*, de los cuales se usó metanol un solvente muy aprovechado por su alta polaridad lo que le ayuda a producir altos rendimientos de extracción, en esta técnica en específico, cumplió su función perfectamente al agregarlo al sedimento de la centrifugación donde se acumuló la biomasa y pigmentos, se observa rápidamente como el solvente diluye los pigmentos de la biomasa, la centrifugación a 4000 rpm por 10 minutos logró sedimentar la biomasa por completo ya que no conserva el color intenso que le proporcionaban los pigmentos sino un color marrón, y los pigmentos se recuperan en el solvente metanol, que a pesar de su desempeño como solvente conserva características tóxicas que podrían ser críticas cuando se lo quiera utilizar en aplicaciones alimentarias y farmacéuticas.

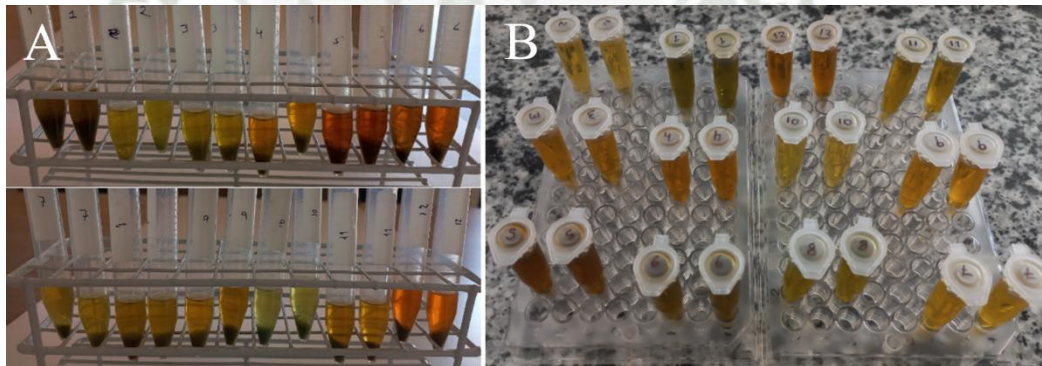


Figura 21. (A) *Extracción de los pigmentos de la biomasa con solvente* (B) *Recuperación de los pigmentos en el solvente.*

10.2 Cuantificación espectrofotométrica de pigmentos

La evaluación para escoger los factores de inducción más efectivos se realizó comparando el contenido de los pigmentos en las biomásas de los experimentos, para la cuantificación se necesitan los valores de absorbancia espectrofotométrica de: carotenoides, clorofila A y B (*Anexo 5*).

Estos valores entonces pasan por las ecuaciones base de de *Linchtenthaler and Wellburn* (104), para determinar el contenido de pigmentos esenciales específicos *Ecuación 2,3,4*. Teniendo en cuenta los coeficientes de absorción específicos para el metanol.

Las tablas de cuantificación de carotenoides con el contenido de pigmentos esenciales del experimento realizado por duplicado, dos veces, dando cuatro repeticiones se muestra en el (*Anexo 6*), el diseño *Plackett-Burman*, tiene una propiedad de proyección (96), es decir permite una rápida detección de variables importantes, el diseño se aplicó con el siguiente modelo:

$$E = \frac{\beta_0 + \sum \beta_i x_i}{N^\circ \text{ de experimentos}}$$

Ecuación 8. *Formula central del diseño Plackett-Burman* (96).

Done E representa el efecto de las variables, B_0 representa la intersección del modelo o el número de niveles, x es la regresión del coeficiente y x_i es el factor independiente.

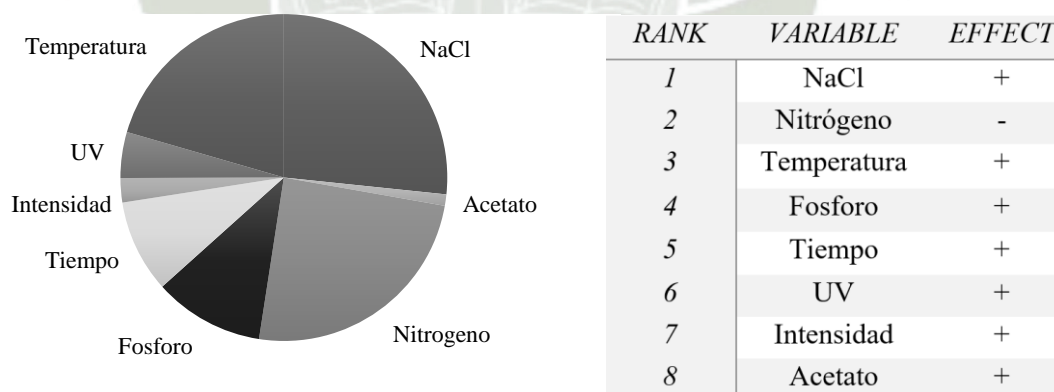


Figura 22. *Esquematización grafica de la importancia de las variables.*

Tabla 5. *Rango de las variables más importantes y sus efectos.*

En general la observación microscópica de todos los ensayos no reveló cambios en la biomasa extremos, como exagerada muerte celular o anomalías en división

celular que es un problema anexo a la exposición prolongada de UV, sin embargo los experimentos que contenían agregado de acetato al medio de cultivo desarrollaron crecimiento de bacterias, aunque la presencia de bacterias en el medio no es perjudicial, es más, microalgas necesitan de una cierta cantidad de microorganismos simbióticos para vivir, estos microorganismos siempre se encuentran en un porcentaje reducido, después de la evaluación microscópica de los experimentos con acetato se reveló contaminación por la fuente carbonada añadida al medio (acetato), lo que generó muerte celular y es por ello que la cuantificación de carotenoides la hizo la variable menos importante *Tabla 5*.

Se logró evidenciar los factores más importantes para la inducción a la carotenogénesis de la cepa *Haematococcus sp.* *Tabla 5.*, de estos, con el fin de optimizar una metodología de inducción, se seleccionaron las 5 variables más importantes: NaCl, nitrógeno, temperatura fosforo y tiempo, las variables químicas se evaluaron con la metodología de superficie de respuesta – *RSM* y las variables físicas con *Taguchi*.

10.2.1 Optimización de los compuestos químicos para inducir la carotenogénesis

Para la optimización de los factores: NaCl, nitrógeno y fosforo, se empleó la metodología de superficie de respuesta utilizando el software estadístico Minitab, se aplicó el diseño y este dio 15 experimentos de los que se hizo una repetición, para todos se trabajó con tres niveles máximo (1), medio (0) y mínimo (-1), el cloruro de sodio demostró ser el mejor inductor con 5gramos por litro, se usó entonces 3,5 y 7 g por litro para evaluar si su efectividad aumenta con la cantidad o si es suficiente con g. para incentivar la inducción, el nitrógeno por otro lado es necesario para la producción de aminoácidos que producen las proteínas que constituyen a las células, normalmente se añade 25 g por litro de compuestos de nitrógeno, y en la primera evaluación se trabajó con un máximo es decir los 25 g y un mínimo 0 g por litro, la falta de esta sal fue la que demostró ser capaz de estresar la cepa, no obstante esta es una sal primordial y su total ausencia puede desencadenar muerte celular

masiva antes de terminar la etapa de enquistamiento por lo que se seleccionaron los niveles: 0,10 y 20 g por litro, en cuanto a las sales de fosforo el nivel que presento importancia en la inducción fue el máximo, 17.5 y 7.5 g de componentes de fosforo sumados en 25 g por litro, se deduce por su importancia en la producción de energía y de ácidos nucleicos (DNA y RNA), para la optimización entonces se evaluó los siguientes niveles: 5, 15 y 25 g por litro (*Anexo 7*).

Los resultados de la cuantificación de carotenoides totales se corrieron con la metodología de superficie de respuesta en el software estadístico Minitab, este utiliza un conjunto de técnicas avanzadas de diseños DOE que ayudan a comprender las variables de respuesta y optimizarlas, la diferencia más relevante con otros diseños factoriales es que la ecuación de *RSM* tienen términos cuadráticos n^2 , lo que le permite modelar curvaturas a las respuestas de las variables, además la ecuación cuadrática de esta metodología permite mapear las regiones de interés lo que la hace útil para encontrar los niveles de las variables y optimizar la técnica (98). Los valores espectrofotométricos se resolvieron con las fórmulas de *Linchtenthaler* (104), para determinar el contenido de pigmentos, una vez hallados los carotenoides totales se juntaron las repeticiones y se aplicó el diseño *RSM* que dio los siguientes resultados.

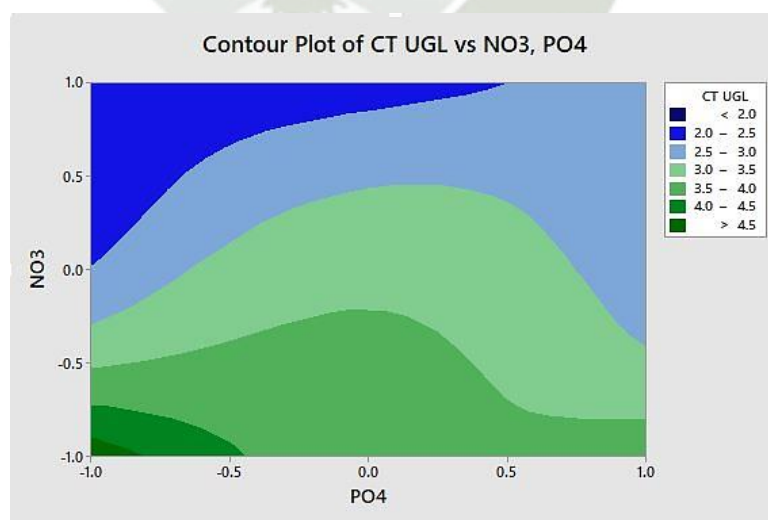


Figura 23. Gráfica de superficie de nitrógeno en relación con fosforo.

El análisis con la metodología de superficie de respuesta ha demostrado que la inducción podría usar incluso menos cantidad que el nivel -1, 5 g por litro de fosforo, en comparación con la cantidad de nitrógeno se observa también que su optimo se encuentra en el mínimo nivel que es el mínimo es decir 0 g por litro, demostrando que la ausencia de esta sal esencial para el crecimiento de las células induce a la producción de astaxantina.

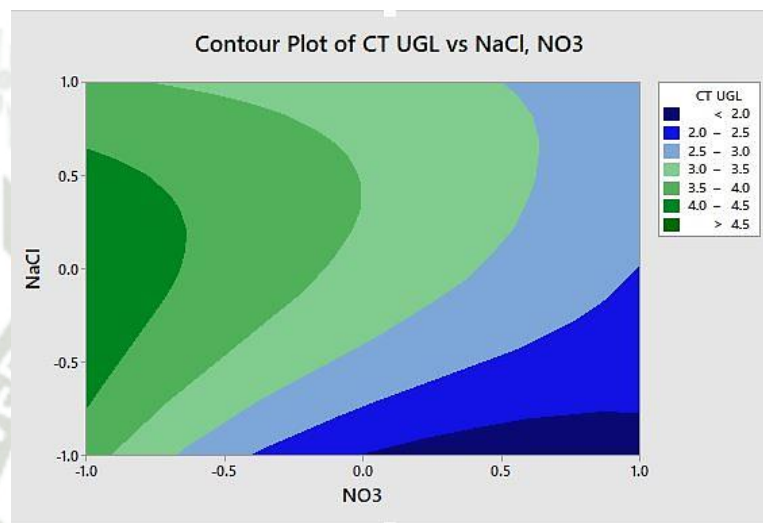


Figura 24. Gráfica de superficies de nitrógeno en relación con cloruro de sodio.

En la *Figura 23*. se confirma que la mínima cantidad de nitrógeno es la óptima para la inducción, sin embargo, el cloruro de sodio presenta un óptimo en la cantidad media, de 5 g por litro, la misma cantidad que mostró la mayor efectividad para el enquistamiento de la cepa en la primera evaluación de la inducción.

En la *Figura 24*. se observa que la cantidad de cloruro de sodio se encuentra en el nivel medio elevándose al nivel máximo, y el fosforo continúa mostrándose como necesario el mínimo nivel para causar la inducción a la carotenogénesis en la cepa, todos estos resultados se encuentran en el contorno de área optimo entre 3.5 y 4.5, aun así, se realizaron corroboraciones con la mínima cantidad de nitrógeno para evaluar las concentraciones de cloruro de sodio y fosforo.

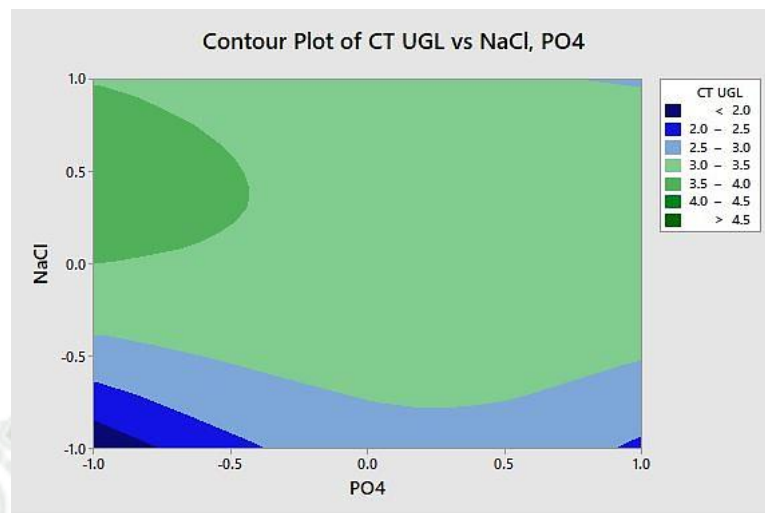


Figura 25. Gráfica de superficies de fosforo en relación con cloruro de sodio.

Para optimizar la metodología de inducción de carotenogenesis en la cepa *Haematococcus sp.* se realizaron corroboraciones por triplicado para asegurar los niveles adecuados de las variables en cuestión, en cuanto a las variables físicas se confirmó que el nitrógeno en su mínima cantidad es el óptimo, por lo que para la corroboración este se usó como constante es decir 0 g de nitrógeno por litro de nitrógeno para evaluar las concentraciones de cloruro de sodio y fosforo.

Según el análisis el cloruro de sodio se encontraba en el nivel medio 5 g/L y ascendiendo al máximo 7 g/L, para la corroboración entonces se tomaron los niveles de: 4, 5 y 6 g por litro a evaluar por triplicado, en cuanto al fosforo se observó en los diagramas que su óptimo está en el mínimo nivel 5 g/L, como se podría incluso usar menos cantidad de esta sal se evaluaron los niveles de: 0, 2.5 y 5 g por litro.

Una vez calculados los carotenoides totales de los triplicados se evaluaron se seleccionaron los niveles que contenían la mayor cantidad de carotenoides, (Anexo 8), en el caso de cloruro de sodio el nivel más efectivo para la inducción fue el medio, 5 g por litro por otra parte el de los compuestos de fosforo la concentración con mejor desempeño fue el nivel máximo 5 g por litro, J. Fábregas et al. reporta la optimización de un medio de cultivo

continuo, en su investigación revelan que sales como nitrógeno y fósforo son esenciales para el crecimiento continuo de la microalga y su reducción en el medio de cultivo puede desencadenar la carotenogénesis (113).

Podemos inferir entonces que la ausencia de nitrógeno, aumentar 5 g/L de cloruro de sodio al medio y disminuir los compuestos de fósforo de 25 g a 5 g/L son las variables químicas óptimas para la inducción de astaxantina, similar a la publicación de J. Fábregas et al. (113).

10.2.2 Optimización de las variables físicas para inducir la carotenogénesis

Para la optimización de los factores: temperatura y tiempo, se empleó el método *Taguchi* para encontrar el mejor ajuste de los parámetros para esto se usó el software estadístico Minitab, el diseño se aplicó y este dio 9 experimentos que se trabajaron por duplicado, de los que se hizo una repetición, se trabajó con tres niveles mínimo (1), medio (2) y máximo (3), la temperatura de 34 °C demostró ser el tercer parámetro más importante para la inducir la carotenogénesis, así que para evaluar si su efectividad aumenta con un incremento en los grados centígrados se evaluó los siguientes niveles: 30, 37 y 45 °C, en cuanto al parámetro de tiempo de iluminación, la primera experimentación probó su eficacia en la inducción con un tratamiento de 24 horas de luz, ya que el tener el cultivo con luz todo el día puede ser costoso y aumenta la huella de carbono, es por esto que se buscó optimizar la cantidad de horas, para lo cual, se evaluó el parámetro en los siguientes niveles: 12, 18 y 24 horas.

Una vez terminada la experimentación se procedió a cuantificar los pigmentos esenciales espectrofotométricamente, entonces, para determinar el contenido de carotenoides totales se usaron las fórmulas de *Linchtenthaler and Wellburn* (104), una vez hallados, los resultados de las repeticiones se juntaron para evaluarlas en conjunto, las tablas se pueden observar en el (*Anexo 9*), seguidamente, se aplicó el método *Taguchi* que dio los siguientes resultados:

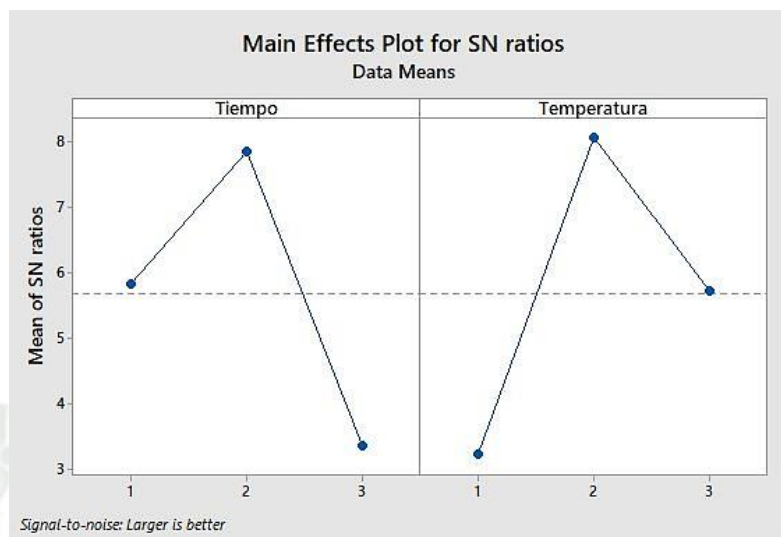


Figura 26. Gráfico de efectos principales en función al tiempo y temperatura.

El método Taguchi, permite con una cantidad reducida de experimentos para evaluar y ajustar múltiples variables manipuladas simultáneamente con resultados sólidos y confiables (97). Los resultados evidenciaron los niveles más importantes como los medios en ambos casos, es decir: la temperatura óptima se reveló como los 37 °C, S.Boussiba et al. reportan resultados similares, después de encontrar que la temperatura adecuada para un cultivo sano de *Haematococcus sp.* era de 28 °C, a su vez notaron el enquistamiento de la cepa a temperaturas mayores de 35 °C (82), con respecto al tiempo de luz, en los niveles mínimo y medio están en el ratio óptimo, por lo que se decidió realizar una corroboración por triplicado de estos dos niveles para aseverar el verdadero valor idóneo para la inducción al enquistamiento, las tablas de análisis se muestran en el (Anexo 10).

Los resultados de la corroboración revelaron que el nivel óptimo es las 18 horas de iluminación, podemos inferir entonces que los parámetros óptimos para la inducción de astaxantina son el aumentar el tiempo de luz a 18 horas al día y una temperatura constante de 37 °C.

10.3 Selección del mejor método de extracción de astaxantina

10.3.1 Preparación de la muestra

Para realizar la evaluación de extracción de astaxantina se necesita biomasa enquistada, es necesario entonces secarla ya que los cambios morfológicos de la cepa *Haematococcus sp.* deben ser tomados en consideración, si bien se puede llevar las células palmelas - etapa verde a células aplanosporas - etapa roja, el conservar la biomasa en un estado de enquistamiento por mucho tiempo después de completar la inducción de las células para la producción de astaxantina, no es factible (105).

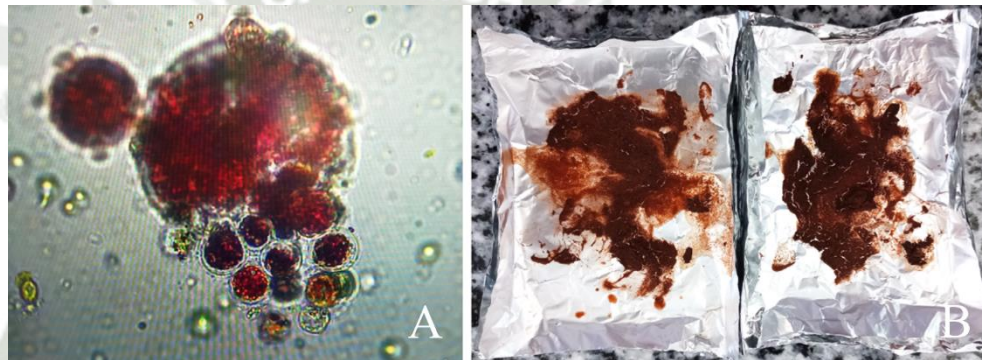


Figura 27. (A) Germinación (B) Resultados del secado de *Haematococcus sp.*.

Las aplanosporas llegan a un tamaño enorme de 30 μm en comparación a las palmelas que oscilan entre los 5 y 15 μm (86), estas aplanosporas llegan a su tamaño máximo y germinan *Figura 27.* produciendo por división celular células flageladas con astaxantina dentro de ellas que van perdiendo siendo sustituida por clorofila, es por ello que debe secar la biomasa para conservarla en un estado de enquistamiento y así poder realizar las evaluaciones necesarias con esta, el cultivo se sedimentó, filtró y se secó en la estufa, siguiendo esta metodología se obtuvo una masa seca de color rojo oscuro, la preocupación al secar la biomasa es degradar la astaxantina, si esto llegara a pasar puede ser fácilmente identificable al terminar con un producto marrón, pero, después de usar una técnica similar a la de Onorato C. et al. se terminó con una biomasa del color clásico de la astaxantina (5)

10.3.2 Evaluación de extracción con solventes

Para esta evaluación se realizó un ensayo por triplicado de la capacidad de extracción con diferentes solventes: acetona, etanol, cloroformo y hexano, que según bibliografía son los más usados y con más éxito extrayendo pigmentos de microalgas.



Figura 28. Trial por triplicado de extracción con solventes, acetona, hexano, etanol y cloroformo (de izquierda a derecha).

Con el fin de seleccionar el solvente más efectivo en desprender los pigmentos de las células se realizó la extracción con 4 solventes, aunque visualmente se puede observar la intensidad de colores, no se puede discernir de evaluación visual, así que se hizo una valoración espectrofotométrica con las longitudes de onda correspondientes a los coeficientes específicos de cada solvente *Tabla 3.*, para hallar cuantificar los carotenoides totales (104), una vez terminados los cálculos, estos se ranquearon de la mayor cuantificación de carotenoides a la menor.

Los resultados dilucidaron la habilidad del etanol para extraer pigmentos, con un promedio de 12.818 mg/L carotenoides totales supera los: 9.608, 8.448, y 4.963 mg/L, extraídos por acetona, cloroformo y hexano respectivamente.

La mejor recuperación de astaxantina se mostró cuando fue tratada con etanol, resultados similares se han reportado y esto se debe a que el etanol es un disolvente polar, lo que significa que tiene cargas positivas y negativas

dentro de su estructura molecular, la astaxantina también es una molécula polar, con múltiples dobles enlaces y grupos funcionales que contribuyen a su polaridad, esta naturaleza polar similar de la astaxantina y el etanol les permite mezclarse bien y disolverse entre sí (9). Además, el etanol es menos tóxico comparado con otros solventes, se puede producir a partir de recursos renovables lo que lo hace una alternativa ecológicamente amigable sin mencionar que es biodegradable y fácilmente evaporable de la muestra, ya que no persiste en el medio ambiente, no es dañino (9,88).

10.3.3 Evaluación de las variables que asisten a la extracción con solventes

Si bien el etanol demostró ser el mejor solvente, se debe tener en cuenta que, la solubilidad de la astaxantina en etanol puede variar, incluso mejorar dependiendo de factores como la temperatura, la concentración y tiempo de exposición. Por esto se aplicó un diseño RSM, que dio 15 experimentos de los que se realizaron una repetición, en donde se evaluaron 3 variables con 3 niveles superior (1), medio (0) e inferior (-1): la temperatura con 20,35 y 50 °C, el tiempo de exposición con 10, 35 y 60 minutos y la concentración con 48, 72 y 96 %. (Anexo 11), una vez hallados y comparados los carotenoides totales se analizó los resultados:

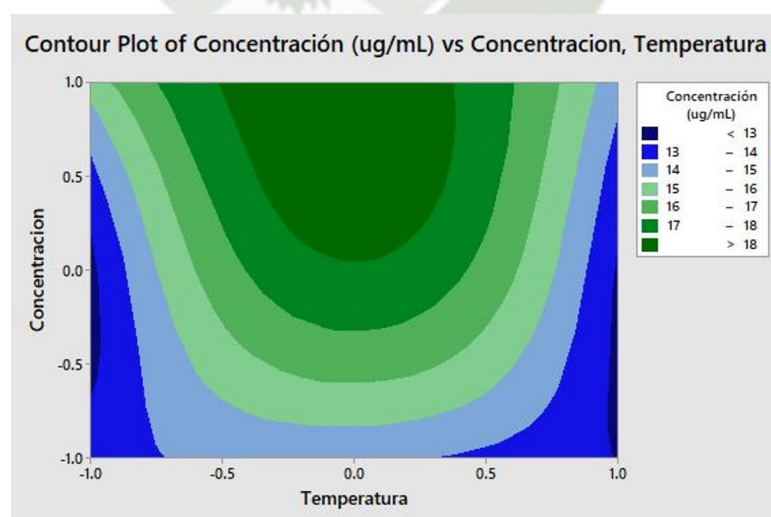


Figura 29. Gráfica de superficies de concentración en relación con temperatura.

Analizando la data y gráficos, se puede discernir que la concentración óptima es la del nivel superior, es decir 96 % de etanol, sin embargo, se puede trabajar con porcentajes mayores a 48 % ya que continúan disolviendo bien la astaxantina, Molino A. et al. reportan que las propiedades de disolver cambian con respecto a la concentración del solvente y de uno a otro, en pocas palabras, normalmente a medida que aumenta la concentración del solvente, generalmente se incrementa la capacidad de disolución de (105), pero no es el caso siempre, es por eso que se evaluó el parámetro de concentración ya que cada soluto y solvente tiene sus propias características y límites de solubilidad, por lo que la concentración óptima puede variar según las sustancias específicas involucradas.

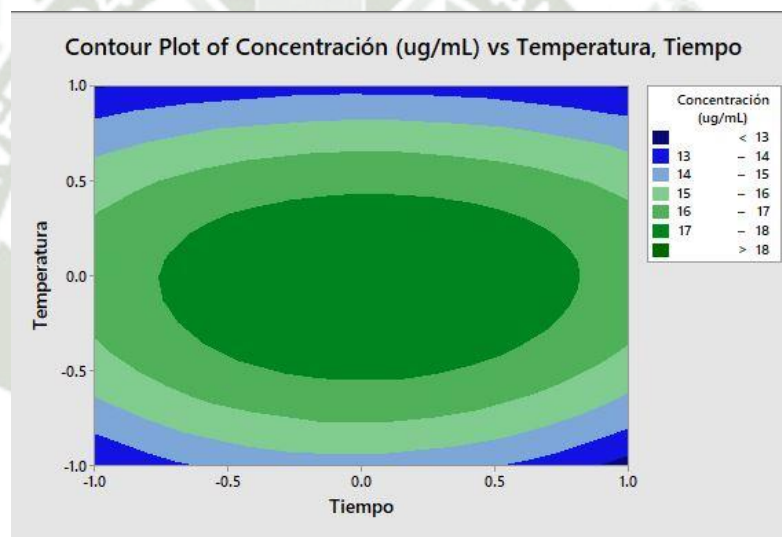


Figura 30. Gráfica de superficies de tiempo en relación con temperatura.

En cuanto a la temperatura, su óptimo se encuentra en el nivel medio de 35 °C, como se puede observar en las Figuras 29 y 30. lo que concuerda con la investigación bibliográfica que reporta, que la temperatura de extracción para microalgas, que son una fuente de astaxantina, generalmente se encuentra entre 25 °C y 40 °C, una temperatura superior no aumenta la cantidad de carotenoides, lo que también es oportuno, porque la astaxantina es una molécula fácilmente degradable por temperaturas mayores a 85 °C (9,112).

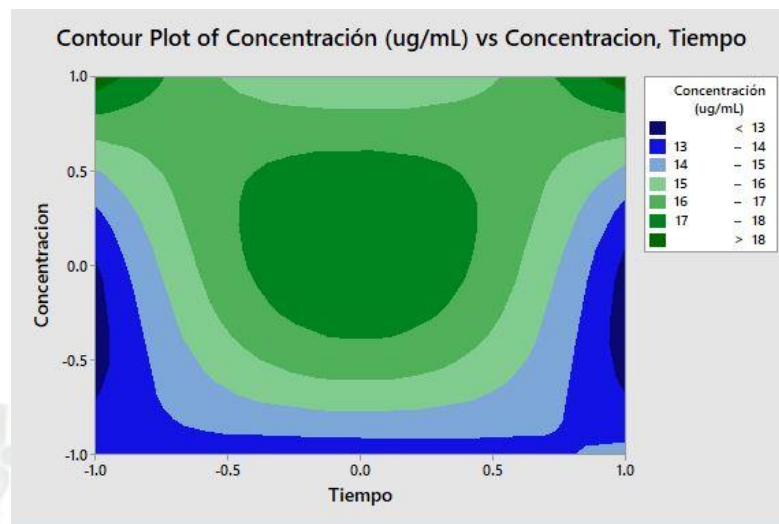


Figura 31. Gráfica de superficies de tiempo en relación con concentración.

El tiempo es un factor importante en la extracción, la duración del contacto entre la biomasa y el solvente puede influir en la eficiencia y el rendimiento (105), pero este tiempo varía según el solvente y al igual que la temperatura, el tiempo de contacto con el solvente está en el nivel medio de 35 min, según Hosikian A. et al. realizaron sus extracciones asistidas por temperaturas de 40 °C en intervalos de 20- 40 min, descubrieron que el tiempo de contacto óptimo puede depender de varios factores, como la concentración del pigmento en la muestra y la temperatura de extracción (100).

En la investigación de Zou et al. (112) evaluaron diferentes proporciones de etanol, acetato de etilo y acetona para su extracción, así como, temperatura y otros parámetros sobre la eficiencia de extracción, informaron que el uso de un disolvente compuesto de etanol para la astaxantina con una extracción a 41,1 °C durante 26 min proporciona el mayor rendimiento de astaxantina, resultados similares a los obtenidos. Entonces, podemos dar por sentado que las condiciones óptimas para la extracción de astaxantina de la cepa *Haematococcus* están en 35 °C por un tiempo de 35 min y etanol en concentración de 96 %. Cabe señalar que aumentar el tiempo de contacto de la biomasa con la solvente afecta significativamente la estabilidad y la calidad de los compuestos carotenoides como la astaxantina (106).

11. PURIFICACIÓN E IDENTIFICACIÓN DE ASTAXANTINA

11.1 Evaluación de la fase móvil idónea para la separación de pigmentos

La elección del solvente adecuado para la cromatografía se basa en la compatibilidad de la fase móvil y la placa de TLC, algunas fases estacionarias, como el gel de sílice, son más adecuadas para ciertos solventes que otras (109), para esta evaluación se consultó a la literatura y se seleccionaron: cloroformo, hexano, acetona y benceno.

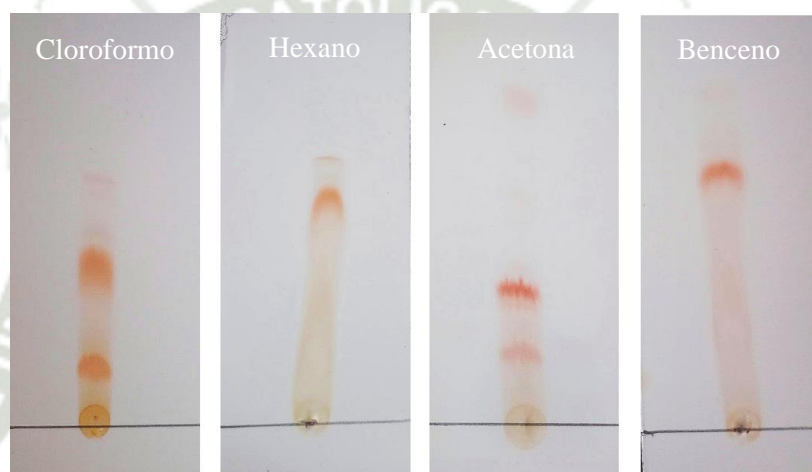


Figura 32. Cromatografías en capa fina con diferentes fases móviles: cloroformo, hexano, acetona y benceno, de izquierda a derecha.

Después de realizar una comparación y evaluación visual de las cromatografías, se evidenció que la mejor separación de pigmentos se dio con las fases móviles de acetona y hexano, en los que se puede claramente distinguir 3 pigmentos producidos por la cepa *Haematococcus*, betacaroteno, astaxantina y clorofila (114), a diferencia del cloroformo *Figura 32*. la separación de compuestos es buena, pero no se pudo hacer medición de la clorofila porque no se pudo identificar, a pesar de realizar el experimento varias veces, el benceno tuvo un comportamiento distintivo en la cromatografía, los pigmentos adquirieron una tonalidad rojiza que los hace difícil de diferenciar, y tomó 8 minutos más en terminar de separar los compuestos.

<i>COEFICIENTES DE RETENCIÓN</i>	<i>ASTAXANTINA</i>	<i>BETACAROTENO</i>	<i>CLOROFILA</i>
Rf (Cloroformo)	0,250	0,367	-
Rf (Hexano)	0,417	0,467	0,317
Rf (Acetona)	0,283	0,583	0,200
Rf (Benceno)	0,467	0,533	0,317

Tabla 6. *Coefficientes de retención de cromatografías en capa fina.*

Para evaluar los factores de retención se usó como referencia la investigación de Lemoine Y. et al (115), donde se identifican a la clorofila, betacaroteno y astaxantina como los principales pigmentos con conocidas migraciones relativas, oscilando entre el 0.29, 0.35 y 0.4 respectivamente.

Los autores han informado valores de Rf de los diferentes carotenoides y clorofila, utilizando eluyentes similares, que están de acuerdo con nuestros resultados(115), en cuanto a los pigmentos en la muestra, se observó aquellos que presentaron mejor separación de compuestos, el hexano y la acetona, tienen factores de retención similares teniendo en cuenta que el hexano separa los pigmentos con más rapidez y la acetona los separa con más distancia, se tomó esto en cuenta para la selección de mezclas, aunque en la cromatografía de cloroformo no se pudo dilucidar la clorofila la separación de compuestos es bastante clara.

El benceno separó bien la muestra sin embargo presenta un problema, aunque es recomendado por la bibliografía, tornó todos los pigmentos de un color rojizo y después de realizar leer al respecto se llegó a la cuenta que fue recomendado por ser un solvente apolar (89) y siendo la astaxantina una molécula lipofílica (112) con afinidad por solventes apolares esta lo haría una fase móvil apta, sin embargo, la muestra de extracto de la cepa *Haematococcus* no solo contiene astaxantina, sino una amplia gama de pigmentos que no reaccionan bien a su baja polaridad y no se llegaron a separar por completo dejando las bandas con el mismo color, se seleccionó las que dieron mejor separación, los solventes: acetona, cloroformo y hexano.

11.2 Evaluación de la pureza de la astaxantina con cromatografía en capa fina bidimensional

La primera evaluación de una TLC bidimensional es la de la diagonal, se traza una línea diagonal desde el punto de muestra y los compuestos que se encuentran en ella son estables, los que se encuentran por debajo de esta es porque se descomponen por interacción de los solventes (104,107), ambas cromatografías muestran que las 2 mezclas de solventes separan los pigmentos sin la descomposición de ellos. La evaluación de sus factores de retención fue rápida, considerando que son similares, para escoger entonces se tomó en cuenta la distribución de los pigmentos en la placa.

COEFICIENTES DE RETENCIÓN	ASTAXANTINA	BETACAROTENO	CLOROFILA
Rf (Acetona+Cloroformo)	0,183	0,317	0,050
Rf (Acetona+Hexano)	0,267	0,350	0,250

Tabla 7. *Coefficientes de retención de TLC bidimensional con diferentes mezclas.*

Las bandas y su distribución en placa son factores importantes para elegir la mejor mezcla para la purificación, ya que se sacarán físicamente de la fase estacionaria, estas bandas representan el área del pigmento puro, mientras más marcada y exacta sea la separación de los pigmentos, más eficaz es la purificación.

En al cromatografía de acetona + cloroformo, se puede observar irregularidades en las bandas, según Ambati R. et al (9), esto puede deberse a que la astaxantina, el betacaroteno, las xantofilas y carotenoides en su mayoría se disuelven bien en solventes apolares por su naturaleza lipofílica, y el cloroformo tienen naturaleza polar, por otro lado la cromatografía con acetona + hexano presenta una excelente separación con bandas fácilmente identificables y áreas para su separación lo suficientemente amplias para una práctica separación manual en la que se puede evitar la mezcla de compuestos.

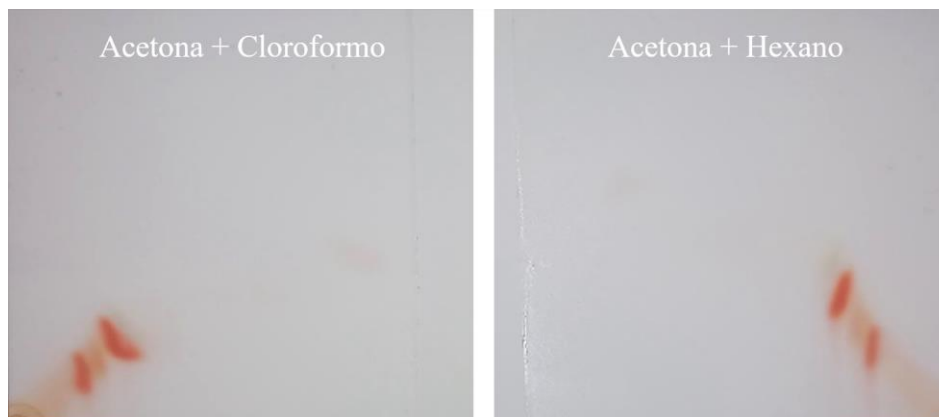


Figura 33. *Cromatografías bidimensionales en capa fina con acetona + cloroformo y acetona + hexano.*

Estas observaciones se complementan con las de Zhang Z. et al (107), su experimentación para mejorar la distribución de los compuestos en su TLC llegó a la conclusión que una mezcla de solventes mejora la afinidad de los compuestos en la fase estacionaria, ya que se juntan solventes con diferentes afinidades, en este experimento se probó que la acetona y el hexano tienen una mejor capacidad para purificar los pigmentos que por separado o en mezcla con otro solvente, por la naturaleza del extracto que contienen múltiples pigmentos con diferentes características se necesitan una mezcla de solventes con propiedades diferentes, en este caso las polaridades opuestas del hexano y la acetona se complementan separando los compuestos que el otro no puede por sí solo.

11.3 Selección de porcentajes de solventes para la fase móvil idónea

Para seleccionar los porcentajes de hexano y acetona, se los evaluó en conjunto, según la literatura esta mezcla de solventes ampliamente usada para separar pigmentos de extractos de microalgas ya que, la acetona es un disolvente polar, miscible en agua, eficaz en la extracción de pigmentos polares como los carotenoides, y también en disolver y pigmentos y pigmentos polares del extracto, el hexano por otro lado es un solvente no miscible en agua, eficaz en la extracción de pigmentos no polares como las clorofilas presentes también en el extracto de *Haematococcus*, al utilizar una combinación de estos dos solventes permitiría que

sus características complementarias logren la separación de una amplia gama de pigmentos y así visualizarlos para analizarlos en la placa de TLC. La selección de los porcentajes a usar se determinó con ayuda de la literatura, estos se ajustan a los pigmentos que se encuentran en la muestra, para la separación de carotenoides generalmente se tiene un punto de partida de 1:3 v/v a 1:4 v/v (89,105).

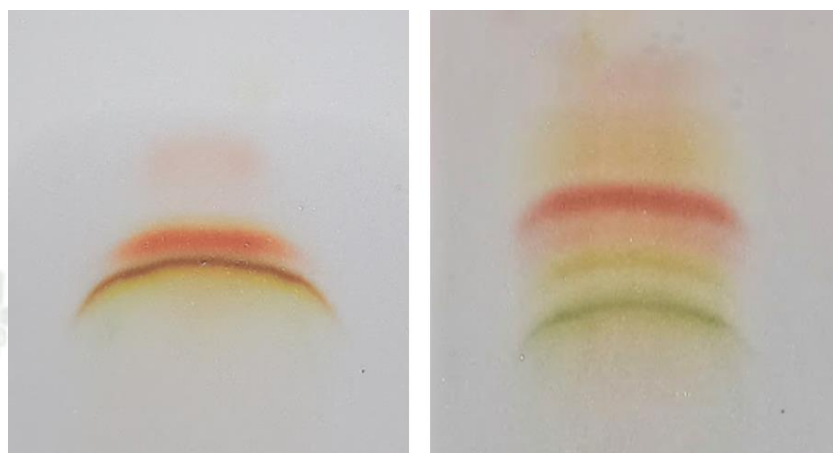


Figura 34. Separación de pigmentos con mezclas 1:4 v/v a 1:3 v/v de acetona y hexano.

Ya conocidos los coeficientes de retención, se realizó una evaluación visual de la separación de los pigmentos para seleccionar la mezcla más apta, la diferencia fue obvia, *Figura 34*, la separación con los porcentajes de 1:4 fue rápida, demoró 6 minutos, 2 minutos menos que la de 1:3 en subir la totalidad de la placa, y aunque se observan los compuestos separados, no presenta suficiente espacio entre estos para realizar la purificación adecuadamente, a diferencia de la cromatográfica con porcentajes e 1:3 que demoró 10 minutos, pero logró una separación amplia entre pigmento y pigmento, que para la purificación es un factor crucial. Estos resultados son similares a los expuestos en la optimización del proceso de Cheong. Jee et al. (108), la mejor fase móvil para separar los pigmentos que obtuvieron de desechos de camarón fue una proporción de acetona + hexano (1:3 v/v), la banda que obtuvieron de astaxantina se obtuvo de TLC con un valor de R_f de 0.33, muy cerca de la obtenida en la cromatografía de acetona + hexano 1:3 a 0.36, de modo que esta fue la concentración fue seleccionada para la cromatografía preparativa.

12. PURIFICACIÓN DE ASTAXANTINA

12.1 Separación de los pigmentos en el extracto crudo con cromatografía preparativa - CPrep

Para esta cromatografía se siguió una metodología similar a la que usa Jaime L. et al (110) para la separación de extracto de espirulina, la cromatografía preparativa realizada del extracto de *Haematococcus sp.* muestra bandas claras y marcadas de entre 0.5 - 1 cm de altura y 6 cm de longitud.



Figura 24. Cromatografía preparativa, sembrado y separación de compuestos (110).

Del raspado de la placa se obtuvo 1.57 gramos de astaxantina, también se logró aislar los otros pigmentos, obteniendo, 1.50 gramos de betacaroteno, 0.83 de clorofila y 0.95 de luteína.

12.2 Extracción y purificación de astaxantina del ensayo CPrep

Los gramos de pigmento contenidos en sílica extraídos de la fase estacionaria fueron tratados con etanol como eluyente para disolver los diferentes compuestos de interés en el solvente y separarlos de la fase estacionaria de sílica, en metodologías similares (89,110), se obtuvieron los mismos resultados, extractos limpios de la fase estacionaria y transparentes sin inclusiones *Figura 35.*, para esto se debe a seleccionar el solvente correcto para que la el líquido quede saturado del pigmento dejando la fase estacionaria blanca y en sedimento después de la centrifugación (9).

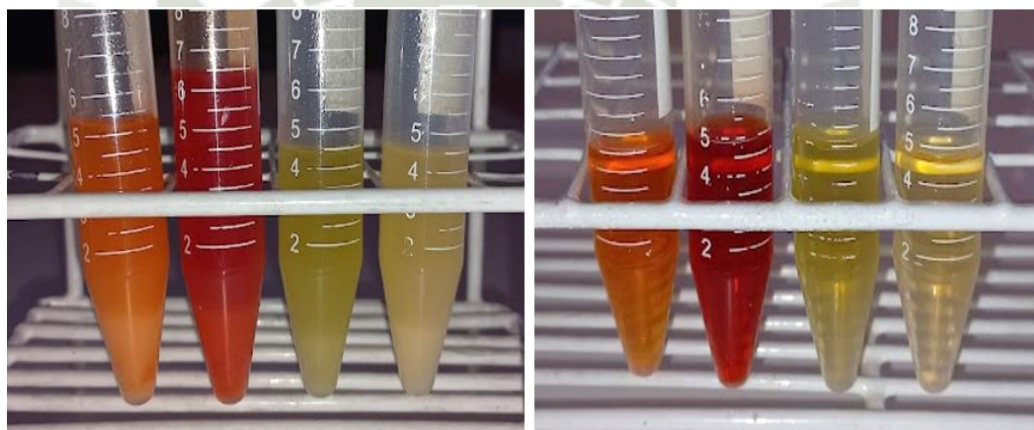


Figura 35. Purificación de pigmentos de la fase estacionaria con etanol.

Una vez obtenido el pigmento en el eluyente, la purificación de este solvente fue simple, ya que el etanol se evapora, pero antes, para asegurar que el pigmento está puro y sin contaminación de otro compuesto se siguió el protocolo de Jaime L. et al (110), que indica tomar una muestra representativa del pigmento disuelto en etanol y realizar una cromatografía en capa fina, para visualizar si hay varias bandas que representarían otros compuestos, el resultado de la TLC fue satisfactorio, se observó *Figura 36.* una sola banda roja en la placa cuyo R_f de 0.33, corresponde a lo reportado por la literatura como astaxantina.

Una vez comprobada la pureza de la astaxantina con la cromatografía, se procedió a liberarla del solvente dejando en evaporación en la incubadora, según recomienda Molino A. et al. (105), ya que el dejar la solución astaxantina + solvente al medio ambiente daña la muestra, por la inestabilidad de la astaxantina que se degrada rápidamente en presencia de oxígeno y luz (112).

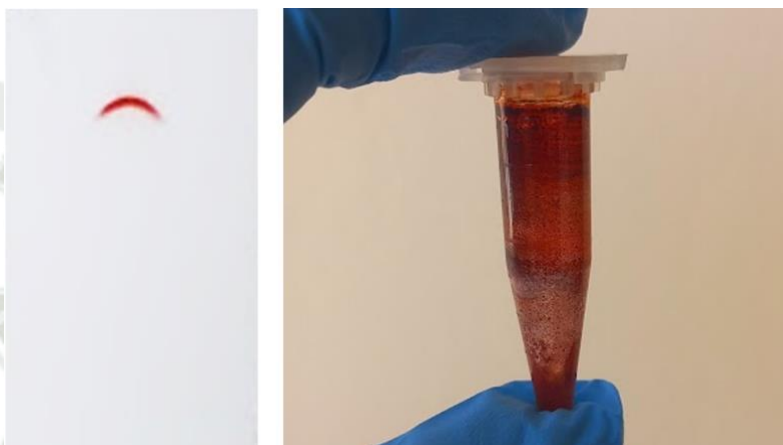


Figura 36. *TLC de astaxantina y astaxantina purificada.*

Molino A. recomienda realizar una evaporación acelerada con ayuda de temperatura, considerando que la astaxantina no es afectada por temperaturas mayores a 80 °C, este procedimiento dio buen resultado, el dejar la muestra abierta en la incubadora a 30 °C resultó en una evaporación rápida en 5 horas, *Figura 36.* dejando la muestra seca habiendo recolectado 0.44 gramos de astaxantina pura.

13. EVALUACIÓN DE LA PUREZA DE LA ASTAXANTINA

13.1 Identificación por barrido espectral de UV-Visible

La identificación de astaxantina con espectrofotometría se basa en la absorción de luz en la región del espectro UV-visible se sabe que tiene una absorbancia característica en la región de 470-480 nm (76). Después de realizar la medición la corrida marco un pico en la región de 476 nm región específica de astaxantina *Figura 37.* y reportada con anterioridad por Zhang X. et al. (116) *Figura 38.*

muestra un pico y distribución espectral idéntico al obtenido con la muestra de astaxantina purificada de *Haematococcus*.

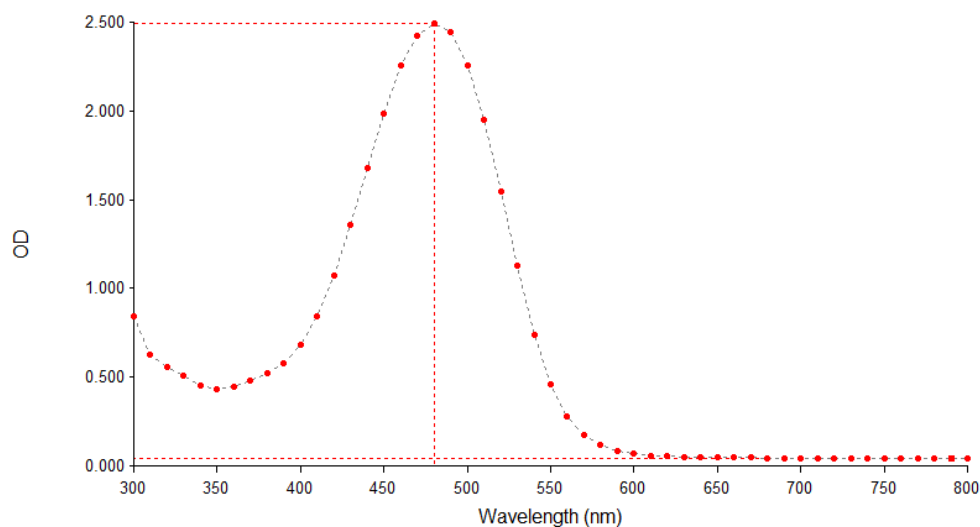


Figura 37. Curva de transmitancia espectral de astaxantina pura.

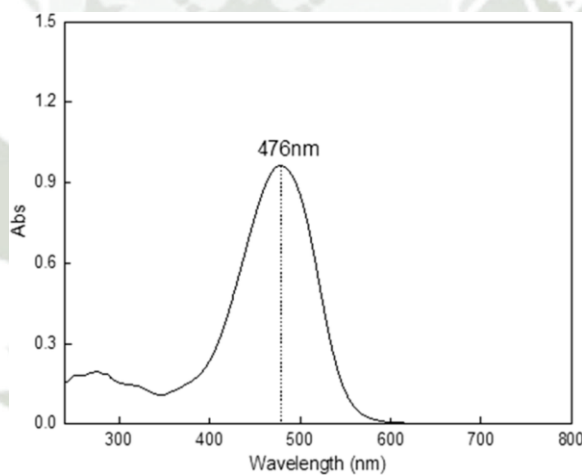


Figura 38. UV-Vis scanning curve of astaxanthin dissolved in ethanol (116).

Con esta data, solo podemos estar seguros de que la muestra evaluada es un carotenoide, ya que si bien el barrido de UV-visible proporciona información de la presencia y la absorbancia de la astaxantina en una muestra, no es suficiente para una identificación definitiva (114). Para una identificación más precisa y confirmación de la astaxantina, se realizó una resonancia magnética nuclear.

13.2 Resonancia magnética nuclear RMN

13.2.1 Análisis del desplazamiento químico

A diferencia del barrido de UV- visible, el espectro de RMN muestra la estructura y conectividad de los átomos de astaxantina, lo que da una identificación sin atisbo de duda (94). El desplazamiento químico se representa en el eje x del espectro de RMN y se expresa en (ppm) partes por millón, ya que cada grupo de hidrógenos tienen un desplazamiento característico puede indicar la posición relativa de los picos en el espectro y está relacionado con el entorno químico de los núcleos en la molécula (94), el trabajo de Dong S. et al. (117) se realizaron perfiles de los metabolitos obtenidos del extracto de *H. pluvialis* mediante RMN, su espectro que se observa en la *Figura 40.*, tiene gran semejanza al espectro obtenido en la corrida de la muestra de astaxantina purificada, *Figura 39.*

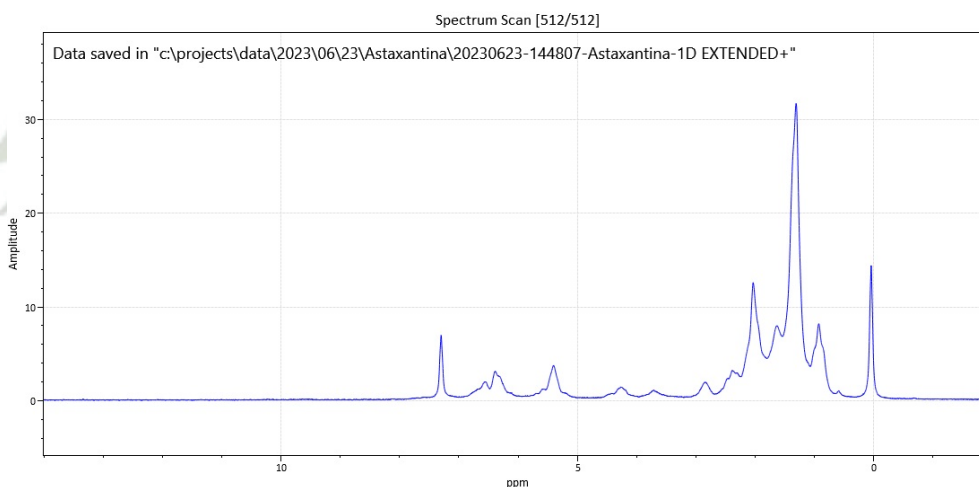


Figura 39. Espectro RMN de astaxantina pura obtenida de *Haematococcus*.

Entonces, al comparar los desplazamientos químicos en diferentes espectros de RMN de la misma molécula, se puede observar cambios en el entorno químico debido a diferentes factores, como cambios en la estructura molecular, interacciones moleculares o condiciones experimentales, pero en general deben conservar una relativa similitud, en cuanto al desplazamiento

químico, este proporciona información sobre el entorno químico del núcleo en la molécula, un mayor desplazamiento químico (mayor ppm) indica un entorno químico diferente. Por lo tanto, el desplazamiento químico en la RMN es una medida de la diferencia en frecuencia de resonancia y proporciona información valiosa sobre la estructura y conectividad de la molécula, la muestra de Dong S. et al. (117), tiene una distribución de los picos característicos de astaxantina entre los rangos de 1 y 7 ppm, también obtenidos en la corrida de la muestra de astaxantina purificada *Figura 39*.

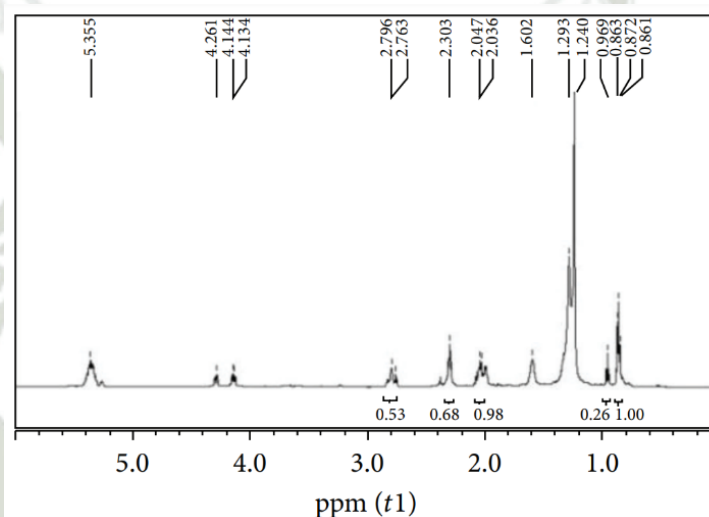


Figura 40. *NMR analysis of astaxanthin extract by MET-ACE method (117).*

13.2.2 Evaluación e interpretación de intensidad de señales

La intensidad de las señales de un espectro NMR ^1H proporcionan información sobre la cantidad de hidrógenos (protones) que mandan una misma señal, así que mediante un análisis de las señales más intensas se puede reconocer los grupos de hidrógenos más abundantes (111). Las señales necesitan ser evaluadas según su desplazamiento, su posición exacta en el espectro, si están más campo abajo (izquierda, cerca de átomos electronegativos) o más campo arriba (derecha, alejado de átomos electronegativos y al TMS), esta posición depende de que tan cerca están los protones de un elemento electronegativo, debido a que este va a tener un

efecto de desprotección denotado a su electronegatividad retirando la densidad electrónica del protón, alejando los electrones del núcleo, causando que la señal este mas campo abajo (118).

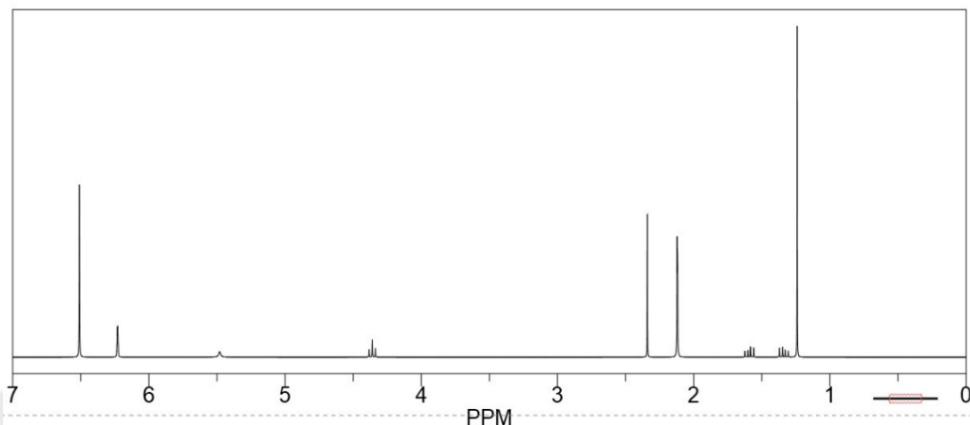


Figura 41. Estimación de la molécula de astaxantina en ChemNMR ¹H.

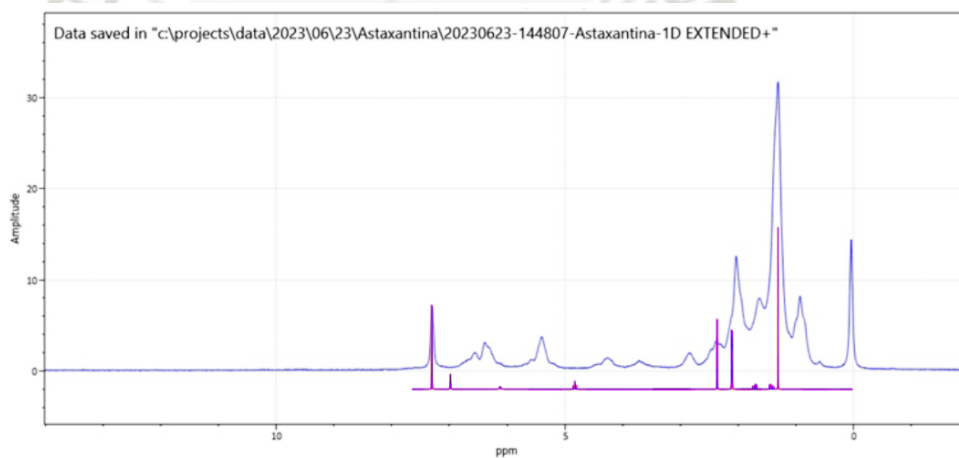


Figura 42. Estimación superpuesta al espectro de astaxantina NMR ¹H.

Antes de correr la muestra se realizó una estimación en ChemNMR ¹H, este programa permitió estimar hasta cierto nivel el desplazamiento y diferentes señales de la molécula, ahora si bien esta estimación es de ayuda la astaxantina tiene diferentes moléculas isómeras, todas tienen los mismos átomos $C_{40}H_{52}O_4$, pero su forma química varía y como el ¹H manda señales de protones basadas en su alrededor y ambiente químico, estas pueden variar

(119). Después de dibujar la molécula en el programa ChemNMR ^1H , se obtuvo la estimación del espectro de astaxantina *Figura 41*. En la *Figura 42* realizo una comparación de las señales químicas experimentales con los calculadas usando el software ChemNMR ^1H , el desplazamiento químico y señalizaciones de la estimación coinciden con las de la corrida experimental ambos se encuentran en el 1 al 7 ppm, para evaluar los picos se fijó especial atención en las señalizaciones que debería mandar de acuerdo con las tablas de interpretación de RMN en el (*Anexo 4*), ChemNMR ^1H también asigna un numero base de desplazamiento químico a sus carbonos determinado por la mecánica molecular del programa (*Anexo 12*).

13.2.3 Evaluación de las correlaciones de integración y acoplamiento o patrones de división

En la molécula de astaxantina tenemos varios protones químicamente equivalentes por ser una molécula simétrica *Figura 1.*, estos protones mientras giran ven el resto de la molécula de la misma forma, experimentando un entorno químico idéntico, considerando que la molécula de astaxantina tiene, varios grupos metilo ($-\text{CH}_3$) y metileno ($-\text{CH}_2$), estos se encuentran en la misma posición relativa en la molécula, uno de estos protones en el grupo metilo mandaría una señal en el espectro, sin embargo si hay varios protones que generan la misma señal esta solo se agrandaría, haciéndola más alta en el espectro, a esto se le conoce como integración, es el área debajo de la señal, el que tan grande o alta esta es, la integración entonces nos da información de cuantos protones químicamente equivalentes están generando un pico en específico (111,118).

En cuanto a los patrones de división, los protones químicamente equivalentes generaran la misma resonancia, pero esta se dividiría en cierto número de picos más pequeños dependiendo de sus protones vecinos, un protón se divide en picos por los protones vecinos en relación con:

Numero de división de picos: $n+1$

Ecuación 9. *Formula del patrón de numero de división de picos (95).*

Donde $n =$ es el número de protones vecinos, por ejemplo, si se tienen 2 protones químicamente equivalentes con 2 protones al lado, la señal se dividiría en 3 picos o un triplete, pueden haber singuletes, dobletes cuartetos y multipletes, en el espectro podemos observar señalizaciones singuletes, dupletes, triplete y multipletes (95,118).

La integral es el área bajo cada pico en el espectro y representa la cantidad de núcleos que contribuyen a ese pico en específico, además proporciona información sobre la relación de abundancia entre los diferentes tipos de núcleos en la molécula (95), por otro lado, la multiplicidad es la forma o patrón de división de un pico en el espectro de RMN, la astaxantina cuenta con varios protones químicamente equivalentes, es decir mandan la misma señal, la molécula cuenta con grupos metilo, metileno, hidroxilo y carbonilo, por ejemplo: el grupo $-CH_3$ con señales en $(C-CH_3, 2.1 - 2.3)$, $(CH_3 -C-CH_3 0.9)$, manda señales de amplias, sugiriendo que hay varios protones están mandando la misma señal, correctamente estimado siendo 12 y 12 hidrógenos respectivamente.

13.2.4 Interpretación del espectro RMN 1H

Para empezar en el espectro se puede observar un pico localizado en 0 ppm, este es el TMS o pico tetrametilsilano, la señal de referencia, por consiguiente, todas las señales se dan en partes por millón en términos de su posición con relación al TMS, importante notar que no es parte de la data.

El pico a 7.25 ppm corresponde a la señal del cloroformo deuterado usado para disolver la muestra de astaxantina pura.

Según el estudio de Sun. W et al. su espectro de astaxantina *Figura 43.*, exhibió los siguientes desplazamientos químicos para su muestra, 1,21 y 1,32 (6H, s,1,1'), 1,81 (2H, t,2,2'), 1,94 (6H, s,5,5'), 1,99 y 2,00 (6H, s,9,9'13,13'), 2,16 (2H, d,13,2,2'-Heq), 3,69 (-OH), 4,30–4,34 (2H, 2,6), y 6,20–6,70 (14H, anillo), en partes por millón (120).

Las señales de la muestra evaluada de astaxantina *Figura 44.*, son similares al estudio por Sun. W. así como a la estimación, para empezar los grupos hidroxilo -OH se encuentra de 3.5 – 3.9 ppm, desplazamiento que se imita en la investigación de Sun. W et al. con un 3.69 ppm, los anillos heterocíclicos se detectaron a 6.20 – 6.60, en la *Figura 43.*, podemos observar que también manda una señal en los rangos de 6.20 – 6.70.

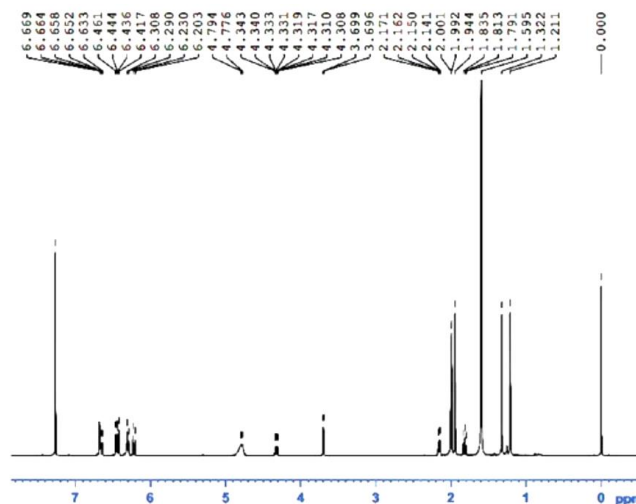


Figura 43. Espectro de astaxantina del estudio de Sun. W et al.(120).

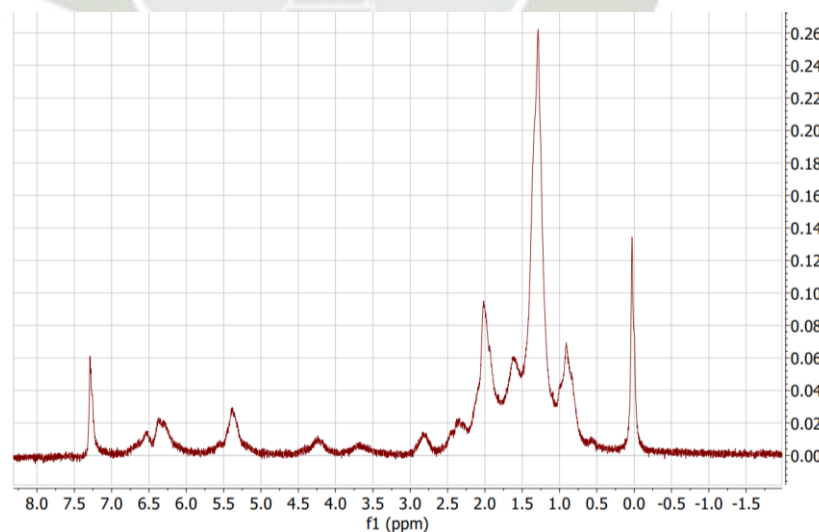


Figura 44. Espectro RMN ¹H de astaxantina pura.

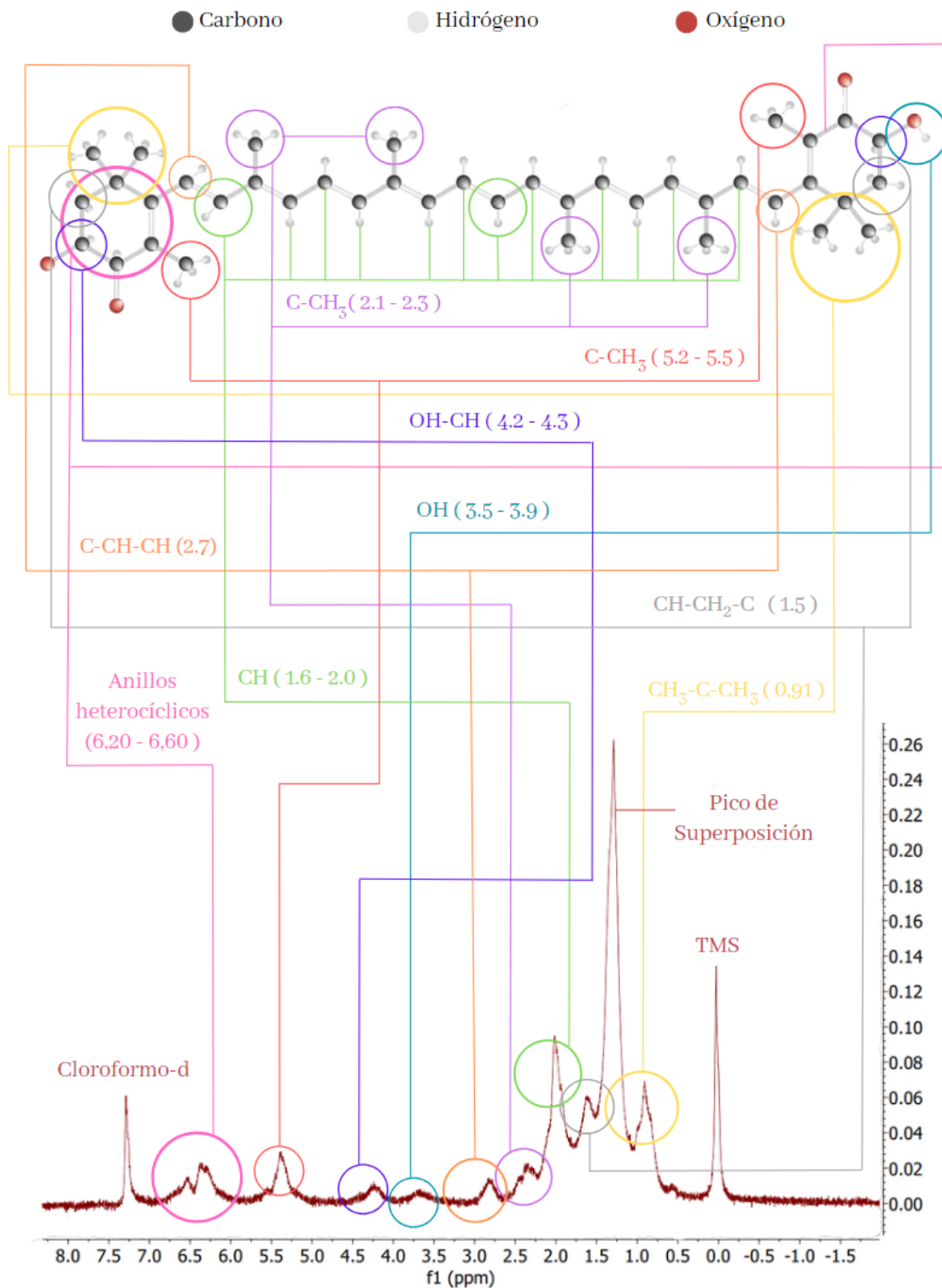


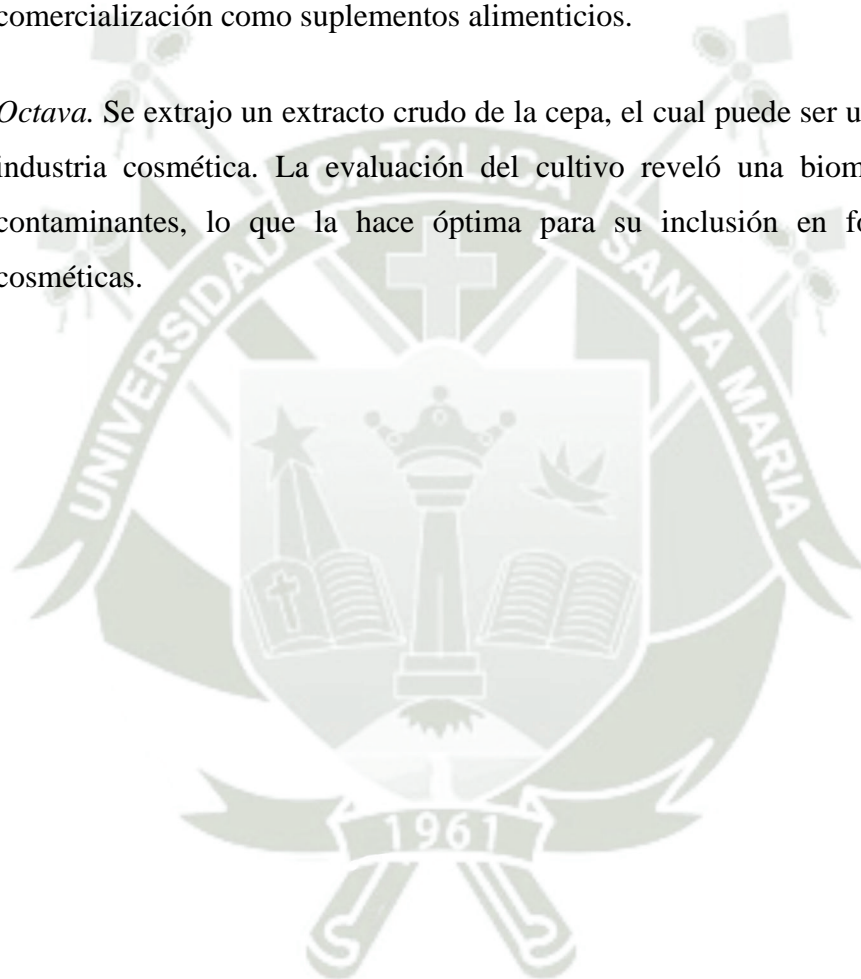
Figura 45. Interpretación del espectro NMR ¹H de la molécula de astaxantina.

En el espectro se observa un pico a 2.7 ppm *Figura 45.*, identificado como la señal correspondiente a C-CH-CH, Sun. W et al. lo reporta a 2.16 y según la estimación se encontraría a 5.59, esto se debe a que esta estimación es de 9-(Z)-astaxantina uno de los isómeros, y la electronegatividad que este protón experimentaría sería mayor por estar cerca a oxígeno ya que esta molécula se dobla en comparación al isómero horizontal all -(E)-astaxantina, *Figura 48.*, este protón al no encontrarse cerca del oxígeno no es drásticamente afectado por su electronegatividad, dejando la señal campo arriba. Los protones que mandan la señal de CH-CH-C, fueron identificados en 1.6 – 2.0 ppm, coincide con la investigación de Sun. W y a la estimación teniendo desplazamientos de 1.99 – 2.00 y 2.12 respectivamente. Según la *Tabla 14.*, la señal de C-CH₃ se debe dar en 1.80 ppm, sin embargo, las interacciones moleculares vecinas pueden afectar las señales de NMR, en este caso hay un pico alto de superposición a 1.25 ppm que afecta todas las señales empujándolas ligeramente campo abajo, esta señal entonces se presenta a 2.1 – 2.3 ppm, *Figura 45.* La señalización de OH-CH se puede observar a 4.2 – 4.3 ppm, ajustándose el resultado de la *Tabla 17.*, se estimó sumando; el estándar de CH (1.55) + el desplazamiento alfa (2.75) y desplazamiento beta (0.00) del sustituyente -OH que este protón mandarían una señal a 4.3 ppm. Los anillos de la molécula afectan dependiendo de su cercanía a grupos como C-CH₃ mencionada antes, pero, esta anexada a el anillo manda una señal diferente, según las tablas debe estar en 5.5 ppm y en espectro se puede observar un pico de 5.2- 5.5 ppm. Otro grupo anexado a los anillos es CH-CH₂-2, este grupo se puede notar de 5.2 – 5.5 ppm, desplazamiento que coincide con el de la estimación en ChemNMR ¹H *Figura 41.*, siendo está a 1.5 ppm. Los grupos metilo de los anillos CH₃-C-CH₃ pueden ser distinguidos en la *Tabla 15.*, con un desplazamiento de 0.91 ppm, valor que se repite en el espectro obtenido con un pico a 0.91 ppm. Después de identificar los grupos que conforman la molécula se identificó el pico más alto a 1.25 ppm como un pico de superposición, no representa ningún grupo de protones en específico sino su sinergia.

CONCLUSIONES

- *Primera.* Se logró obtener biomasa unicelular de la cepa de *Haematococcus sp.* haciendo uso de metodologías de aislamiento por centrifugación, medio restringido y diluciones seriadas que purifico la biomasa para su escalamiento con burbujeo y 12 h de luz/12 h oscuridad.
- *Segunda.* Los parámetros más eficientes de los 8 evaluados para la desencadenar la producción de astaxantina “carotenogénesis” fueron los siguientes: incremento a 5 g/L de cloruro de sodio al medio BBM, reducción de los compuestos de fosforo de 25 g a 5 g/L, incremento del tiempo de luz de 12 h a 18 h al día y una temperatura constante de 37 °C.
- *Tercera.* Se optimizó la metodología para la extracción de astaxantina, determinando que el solvente eco amigable, etanol al 96 % es superior en diluir los pigmentos de la cepa obteniendo un promedio de cuantificación de 12.818 mg/L de carotenoides totales.
- *Cuarta.* Se delimitó que para obtener la mayor cantidad posible de principio activo los factores acompañantes para una extracción ideal deben ser: elevar la temperatura a 35 °C por un tiempo de 35 minutos.
- *Quinta.* Se logró purificar la astaxantina haciendo uso de una cromatografía preparativa con una fase móvil de acetona y hexano a una concentración de 1:3 y 0.36 respectivamente, el raspado de placa y extracción con etanol dejó un recolectado de 0.44 g de astaxantina pura, así mismo logró identificar el pigmento como astaxantina, con un barrido espectral de UV- visible que dio un pico en la región de 476 nm región específica de astaxantina y una resonancia magnética nuclear cuya corrida tuvo el desplazamiento químico de 0 a 7 ppm con las señalizaciones características de la astaxantina.

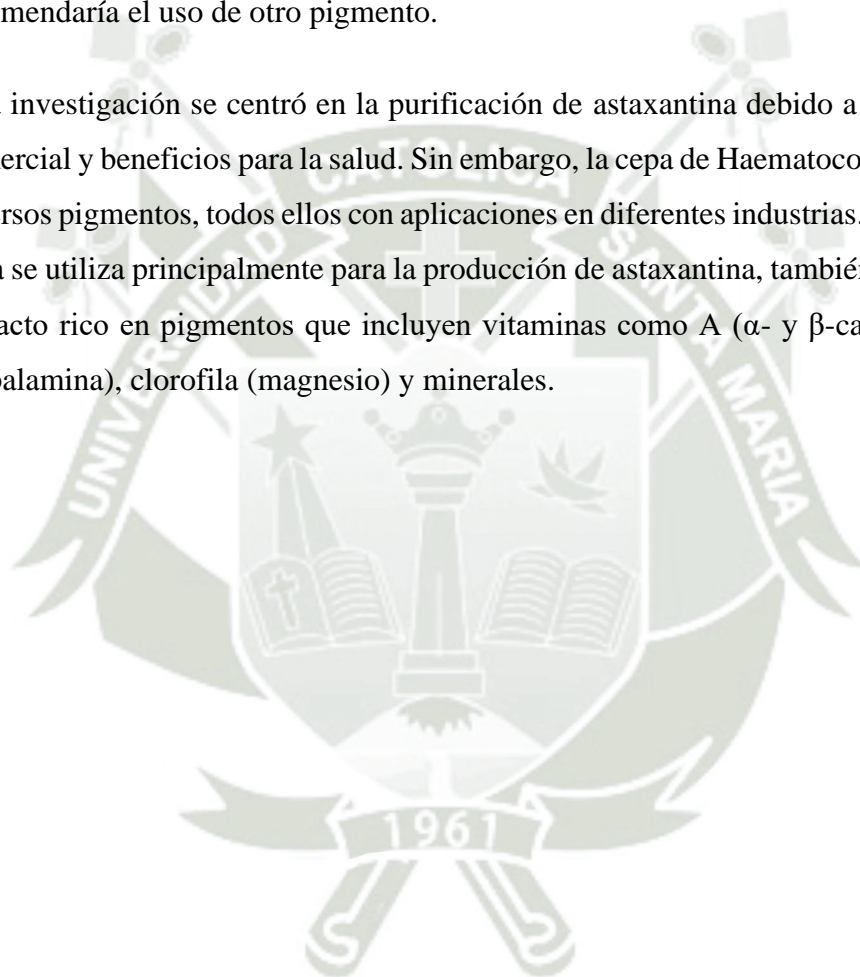
- *Sexta.* Se logró aislar el compuesto astaxantina, lo que permite su aplicación en la industria médica para la experimentación en líneas celulares, así como para evaluar sus respuestas a diversas concentraciones de astaxantina pura.
- *Séptima.* Se logró purificar todos los pigmentos del extracto de *Haematococcus sp.*, incluyendo betacaroteno, clorofila, luteína y astaxantina. Esto fomenta su utilización en la industria nutracéutica, facilitando su dilución en aceites y su comercialización como suplementos alimenticios.
- *Octava.* Se extrajo un extracto crudo de la cepa, el cual puede ser utilizado en la industria cosmética. La evaluación del cultivo reveló una biomasa libre de contaminantes, lo que la hace óptima para su inclusión en formulaciones cosméticas.



RECOMENDACIONES

- Se recomienda realizar la evaluación de los 8 parámetros de inducción a la producción de astaxantina en diferentes cepas de *Haematococcus sp.* ya que los factores más eficientes para desencadenar la carotenogénesis pueden variar.
- Durante este estudio se llevó a cabo una revisión exhaustiva de la literatura científica que aborda los espectros de astaxantina utilizando la técnica de resonancia magnética nuclear de protones (NMR 1H). Se encontró una cantidad limitada de estudios que utilizan esta técnica en particular. Por lo tanto, se recomienda realizar más investigaciones utilizando NMR 1H, ya que es un método altamente preciso para la identificación molecular.
- En este trabajo se logró optimizar el Down stream de la extracción y purificación de astaxantina, para su uso en industria médica, nutracéutica, dermo y bio cosmética, La optimización no solo implica mejoras en métodos, sino también en términos económicos. Sin embargo, la producción de astaxantina sigue siendo costosa y tiene aplicaciones en otras industrias que no tienen el capital de las mencionadas anteriormente, como la acuicultura y la industria textil. En el caso de la industria acuícola, el proceso propuesto sería el siguiente: se prepararía un medio de cultivo BBM con antibióticos y malaquita verde para evitar la contaminación bacteriana y fúngica en una botella de 7 L. Luego, se cultivaría la cepa Hematococcus sp., utilizando una bomba de aire conectada a una manguera dentro de la botella para airear el medio y promover la proliferación de la cepa. Una vez que se haya acumulado suficiente biomasa, se agregarían 5 g de sal por litro de medio para inducir la producción de astaxantina en la cepa, es decir, "estresarla". Una vez que la cepa haya alcanzado la etapa roja, se dejaría que el cultivo se sedimente y se transferiría el medio a otra botella para repetir el ciclo con las *Haematococcus* flageladas que se encuentran en el sobrenadante. El sedimento se transferiría a una fibra de plástico para secarlo al sol, y después de 2 días se molería para agregarlo al alimento de peces como salmón, trucha, camarones, langostas, entre otros.

- En el caso de la industria textil, se ha realizado investigación sobre su comportamiento como colorante textil por su color rojo sangre resulta atractivo, y aunque la astaxantina es un carotenoide, lo que lo hace un pigmento y posible colorante esta tiene limitaciones, es difícil de fijar incluso con mordientes por sus características lipofílicas e hidrofílicas que son lo que lo hace poco estable y de difícil fijación en textiles pero un excelente antioxidante, en el caso de la industria textil recomendaría el uso de otro pigmento.
- Esta investigación se centró en la purificación de astaxantina debido a su alto valor comercial y beneficios para la salud. Sin embargo, la cepa de *Haematococcus* produce diversos pigmentos, todos ellos con aplicaciones en diferentes industrias. Aunque esta cepa se utiliza principalmente para la producción de astaxantina, también contiene un extracto rico en pigmentos que incluyen vitaminas como A (α - y β -caroteno), B12 (cobalamina), clorofila (magnesio) y minerales.



REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Panis G, Carreon JR. Commercial astaxanthin production derived by green alga *Haematococcus pluvialis*: A microalgae process model and a techno-economic assessment all through production line. *Algal Res.* 2016 Sep;18:175–90.
2. Nilesh Hemantkumar J, Ilza Rahimbhai M. Microalgae and Its Use in Nutraceuticals and Food Supplements. In: *Microalgae - From Physiology to Application*. IntechOpen; 2020.
3. Ren Y, Deng J, Huang J, Wu Z, Yi L, Bi Y, et al. Using green alga *Haematococcus pluvialis* for astaxanthin and lipid co-production: Advances and outlook. *Bioresour Technol.* 2021 Nov;340:125736.
4. Gong M, Bassi A. Carotenoids from microalgae: A review of recent developments. *Biotechnol Adv.* 2016 Dec;34(8):1396–412.
5. Onorato C, Rösch C. Comparative life cycle assessment of astaxanthin production with *Haematococcus pluvialis* in different photobioreactor technologies. *Algal Res.* 2020 Sep;50:102005.
6. Shah MdMR, Liang Y, Cheng JJ, Daroch M. Astaxanthin-Producing Green Microalga *Haematococcus pluvialis*: From Single Cell to High Value Commercial Products. *Front Plant Sci.* 2016 Apr 28;7.
7. Khoo KS, Lee SY, Ooi CW, Fu X, Miao X, Ling TC, et al. Recent advances in biorefinery of astaxanthin from *Haematococcus pluvialis*. *Bioresour Technol.* 2019 Sep;288:121606.
8. Yan T, Li H, Wu J, Niu Q, Duan W, Han Q, et al. Astaxanthin inhibits gemcitabine-resistant human pancreatic cancer progression through EMT inhibition and gemcitabine resensitization. *Oncol Lett.* 2017 Aug 28;
9. Ambati R, Phang SM, Ravi S, Aswathanarayana R. Astaxanthin: Sources, Extraction, Stability, Biological Activities and Its Commercial Applications—A Review. *Mar Drugs.* 2014 Jan 7;12(1):128–52.
10. Rodríguez-deLeón E, Jiménez-Halla J, Báez J, Bah M. A Simple and Efficient Method for the Partial Synthesis of Pure (3R,3'S)-Astaxanthin from (3R,3'R,6'R)-Lutein and Lutein Esters via (3R,3'S)-Zeaxanthin and Theoretical Study of Their Formation Mechanisms. *Molecules.* 2019 Apr 9;24(7):1386.
11. Seabra LMJ, Pedrosa LFC. Astaxanthin: structural and functional aspects. *Revista de Nutrição.* 2010 Dec;23(6):1041–50.

12. Meléndez-Martínez AJ, Mandić AI, Bantis F, Böhm V, Borge GIA, Brnčić M, et al. A comprehensive review on carotenoids in foods and feeds: *status quo*, applications, patents, and research needs. *Crit Rev Food Sci Nutr*. 2022 Mar 20;62(8):1999–2049.
13. Higuera-Ciapara I, Félix-Valenzuela L, Goycoolea FM. Astaxanthin: A Review of its Chemistry and Applications. *Crit Rev Food Sci Nutr*. 2006 Mar;46(2):185–96.
14. Vázquez M, Martin AM. Optimization of *Phaffia rhodozyma* continuous culture through response surface methodology. Vol. 57. 1998. 314–320 p.
15. Petri D, Lundebye AK. Tissue distribution of astaxanthin in rats following exposure to gaded levels in the feed. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*. 2007 Mar;145(2):202–9.
16. Yoshihara T, Sugiura T, Shibaguchi T, Naito H. Role of astaxanthin supplementation in prevention of disuse muscle atrophy: a review. *J Phys Fit Sports Med*. 2019 Mar 25;8(2):61–71.
17. Kim JH. Astaxanthin Inhibits H₂O₂-Mediated Apoptotic Cell Death in Mouse Neural Progenitor Cells via Modulation of P38 and MEK Signaling Pathways. *J Microbiol Biotechnol*. 2009;19.
18. Park JS, Chyun JH, Kim YK, Line LL, Chew BP. Astaxanthin decreased oxidative stress and inflammation and enhanced immune response in humans. *Nutr Metab (Lond)*. 2010 Dec 5;7(1):18.
19. Rao AR, Sarada R, Shylaja MD, Ravishankar GA. Evaluation of hepatoprotective and antioxidant activity of astaxanthin and astaxanthin esters from microalga-*Haematococcus pluvialis*. *Journal of Food Science and Technology*. 2015 Oct 5;6703–10.
20. Wu H, Niu H, Shao A, Wu C, Dixon B, Zhang J, et al. Astaxanthin as a Potential Neuroprotective Agent for Neurological Diseases. *Mar Drugs*. 2015 Sep 11;13(9):5750–66.
21. Galasso C, Orefice I, Pellone P, Cirino P, Miele R, Ianora A, et al. On the Neuroprotective Role of Astaxanthin: ¿New Perspectives? *Mar Drugs*. 2018 Jul 24;16(8):247.
22. Xia W, Tang N, Kord-Varkaneh H, Low TY, Tan SC, Wu X, et al. The effects of astaxanthin supplementation on obesity, blood pressure, CRP, glycemic biomarkers, and lipid profile: A meta-analysis of randomized controlled trials. *Pharmacol Res*. 2020 Nov;161:105113.

23. Faraone I, Sinisgalli C, Ostuni A, Armentano MF, Carmosino M, Milella L, et al. Astaxanthin anticancer effects are mediated through multiple molecular mechanisms: A systematic review. *Pharmacol Res.* 2020 May;155:104689.
24. Fassett RG, Coombes JS. Astaxanthin: A Potential Therapeutic Agent in Cardiovascular Disease. *Mar Drugs.* 2011 Mar 21;9(3):447–65.
25. Fassett RG, Coombes JS. Astaxanthin, oxidative stress, inflammation and cardiovascular disease. *Future Cardiol.* 2009 Jul;5(4):333–42.
26. Kohandel Z, Farkhondeh T, Aschner M, Pourbagher-Shahri AM, Samarghandian S. Anti-inflammatory action of astaxanthin and its use in the treatment of various diseases. *Biomedicine & Pharmacotherapy.* 2022 Jan;145:112179.
27. Lim KC, Yusoff FMd, Shariff M, Kamarudin MS. Dietary astaxanthin augments disease resistance of Asian seabass, *Lates calcarifer* (Bloch, 1790), against *Vibrio alginolyticus* infection. *Fish Shellfish Immunol.* 2021 Jul;114:90–101.
28. Kupcinkas L, Lafolie P, Lignell Å, Kiudelis G, Jonaitis L, Adamonis K, et al. Efficacy of the natural antioxidant astaxanthin in the treatment of functional dyspepsia in patients with or without *Helicobacter pylori* infection: A prospective, randomized, double blind, and placebo-controlled study. *Phytomedicine.* 2008 Jun;15(6–7):391–9.
29. Kato T, Kasai T, Sato A, Ishiwata S, Yatsu S, Matsumoto H, et al. Effects of 3-Month Astaxanthin Supplementation on Cardiac Function in Heart Failure Patients with Left Ventricular Systolic Dysfunction-A Pilot Study. *Nutrients.* 2020 Jun 26;12(6):1896.
30. Lindsey K, Bridget M, Boon C. Astaxanthin Mediates Inflammation Biomarkers Associated with Arthritis in Human Chondrosarcoma Cells Induced with Interleukin-1 β . *American Journal of Advanced Food Science and Technology.* 2013;
31. Peng Y, Lu J, Liu F, Lee C, Lee H, Ho Y, et al. Astaxanthin attenuates joint inflammation induced by monosodium urate crystals. *The FASEB Journal.* 2020 Aug 10;34(8):11215–26.
32. Kamath BS, Srikanta BM, Dharmesh SM, Sarada R, Ravishankar GA. Ulcer preventive and antioxidative properties of astaxanthin from *Haematococcus pluvialis*. *Eur J Pharmacol.* 2008 Aug;590(1–3):387–95.
33. Comhaire FH, Garem Y El, Mahmoud A, Eertmans F, Schoonjans F. Combined conventional/antioxidant “Astaxanthin” treatment for male infertility: a double blind, randomized trial. *Asian J Androl.* 2005 Sep;7(3):257–62.
34. Butler T, Golan Y. Astaxanthin Production from Microalgae. In: *Microalgae Biotechnology for Food, Health and High Value Products.* Singapore: Springer Singapore; 2020. p. 175–242.

35. Fernandes SD, Narayana RC, Narayanan A V. The emergence of India as a blossoming market for nutraceutical supplements: An overview. *Trends Food Sci Technol*. 2019 Apr;86:579–85.
36. Nelson FP, Rumsfield J. Cosmetics Content and Function. *Int J Dermatol*. 1988 Dec;27(10):665–72.
37. Lima SGM, Freire MCLC, Oliveira V da S, Solisio C, Converti A, de Lima ÁAN. Astaxanthin Delivery Systems for Skin Application: A Review. *Mar Drugs*. 2021 Sep 9;19(9):511.
38. Yoon HS, Cho HH, Cho S, Lee SR, Shin MH, Chung JH. Supplementing with Dietary Astaxanthin Combined with Collagen Hydrolysate Improves Facial Elasticity and Decreases Matrix Metalloproteinase-1 and -12 Expression: A Comparative Study with Placebo. *J Med Food*. 2014 Jul;17(7):810–6.
39. Sun Q, Wu J, Qian G, Cheng H. Effectiveness of Dietary Supplement for Skin Moisturizing in Healthy Adults: A Systematic Review and Meta-Analysis of Randomized Controlled Trials. *Front Nutr*. 2022 Jun 2;9.
40. Chalyk NE, Klochkov VA, Bandaletova TY, Kyle NH, Petyaev IM. Continuous astaxanthin intake reduces oxidative stress and reverses age-related morphological changes of residual skin surface components in middle-aged volunteers. *Nutrition Research*. 2017 Dec;40–8.
41. Singh KN, Patil S, Barkate H. Protective effects of astaxanthin on skin: Recent scientific evidence, possible mechanisms, and potential indications. *J Cosmet Dermatol*. 2020 Jan 29;19(1):22–7.
42. Ritto D, Tanasawet S, Singkhorn S, Klaypradit W, Hutamekalin P, Tipmanee V, et al. Astaxanthin induces migration in human skin keratinocytes via Rac1 activation and RhoA inhibition. *Nutr Res Pract*. 2017;11(4):275.
43. Veeruraj A, Liu L, Zheng J, Wu J, Arumugam M. Evaluation of astaxanthin incorporated collagen film developed from the outer skin waste of squid *Doryteuthis singhalensis* for wound healing and tissue regenerative applications. *Materials Science and Engineering: C*. 2019 Feb;95:29–42.
44. Coenraads PJ, Vogel TA, Blömeke B, Goebel C, Roggeband R, Schuttelaar MLA. The role of the antioxidant ascorbic acid in the elicitation of contact allergic reactions to *p*-phenylenediamine. *Contact Dermatitis*. 2016 May;74(5):267–72.
45. Trakanwittayarak S, Meephansan J. The effect of astaxanthin on allergic contact dermatitis in response to hair dye containing *p*-phenylenediamine. *European Journal of Dermatology*. 2019 Dec;29(6):647–8.

46. Davinelli S, Nielsen M, Scapagnini G. Astaxanthin in Skin Health, Repair, and Disease: A Comprehensive Review. *Nutrients*. 2018 Apr 22;10(4):522.
47. Xue XL, Han XD, Li Y, Chu XF, Miao WM, Zhang JL, et al. Astaxanthin attenuates total body irradiation-induced hematopoietic system injury in mice via inhibition of oxidative stress and apoptosis. *Stem Cell Res Ther*. 2017 Dec 23;8(1):7.
48. Ni Y, Nagashimada M, Zhuge F, Zhan L, Nagata N, Tsutsui A, et al. Astaxanthin prevents and reverses diet-induced insulin resistance and steatohepatitis in mice: A comparison with vitamin E. *Sci Rep*. 2015 Nov 25;5(1):17192.
49. Turkez H, Geyikoglu F, Yousef MI. Beneficial effect of astaxanthin on 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo- *p* -dioxin-induced liver injury in rats. *Toxicol Ind Health*. 2013 Aug 6;29(7):591–9.
50. Shen M, Chen K, Lu J, Cheng P, Xu L, Dai W, et al. Protective Effect of Astaxanthin on Liver Fibrosis through Modulation of TGF- β 1 Expression and Autophagy. *Mediators Inflamm*. 2014;2014:1–14.
51. Nakao R, Nelson OL, Park JS, Mathison BD, Thompson PA, Chew BP. Effect of astaxanthin supplementation on inflammation and cardiac function in BALB/c mice. *Anticancer Res*. 2010 Jul;30(7):2721–5.
52. Goss GJ, Lockwood SF. Cardioprotection and myocardial salvage by a disodium disuccinate astaxanthin derivative (Cardax™). *Life Sci*. 2004 May;75(2):215–24.
53. Augusti PR, Quattrin A, Somacal S, Conterato GM, Sobieski R, Ruviaro AR, et al. Astaxanthin prevents changes in the activities of thioredoxin reductase and paraoxonase in hypercholesterolemic rabbits. *J Clin Biochem Nutr*. 2012;51(1):42–9.
54. Goss GJ, Lockwood SF. Acute and chronic administration of disodium disuccinate astaxanthin (Cardax™) produces marked cardioprotection in dog hearts. *Mol Cell Biochem*. 2005 Apr;272(1–2):221–7.
55. Goss GJ, Hazen SL, Lockwood SF. Seven day oral supplementation with Cardax™ (disodium disuccinate astaxanthin) provides significant cardioprotection and reduces oxidative stress in rats. *Mol Cell Biochem*. 2006 Feb;283(1–2):23–30.
56. Cort A, Ozturk N, Akpınar D, Unal M, Yucel G, Ciftcioglu A, et al. Suppressive effect of astaxanthin on retinal injury induced by elevated intraocular pressure. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*. 2010 Oct;58(1):121–30.
57. Naito Y, Uchiyama K, Aoi W, Hasegawa G, Nakamura N, Yoshida N, et al. Prevention of diabetic nephropathy by treatment with astaxanthin in diabetic db/db mice. *BioFactors*. 2004;20(1):49–59.

58. Dave GS, Kalia K. Hyperglycemia induced oxidative stress in type-1 and type-2 diabetic patients with and without nephropathy. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)*. 2007 May 30;53(5):68–78.
59. Ravi Kumar S, Narayan B, Sawada Y, Hosokawa M, Miyashita K. Combined effect of astaxanthin and squalene on oxidative stress in vivo. *Mol Cell Biochem*. 2016 Jun 17;417(1–2):57–65.
60. Landon R, Gueguen V, Petite H, Letourneur D, Pavon-Djavid G, Anagnostou F. Impact of Astaxanthin on Diabetes Pathogenesis and Chronic Complications. *Mar Drugs*. 2020 Jul 9;18(7):357.
61. Yang Y, Pham TX, Wegner CJ, Kim B, Ku CS, Park YK, et al. Astaxanthin lowers plasma TAG concentrations and increases hepatic antioxidant gene expression in diet-induced obesity mice. *British Journal of Nutrition*. 2014 Dec 14;112(11):1797–804.
62. Arunkumar E, Bhuvaneswari S, Anuradha CV. An intervention study in obese mice with astaxanthin, a marine carotenoid – effects on insulin signaling and pro-inflammatory cytokines. *Food Funct*. 2012;3(2):120–6.
63. Chen JC, Wu CH, Peng YS, Zheng HY, Lin YC, Ma PF, et al. Astaxanthin enhances erlotinib-induced cytotoxicity by p38 MAPK mediated xeroderma pigmentosum complementation group C (XPC) down-regulation in human lung cancer cells. *Toxicol Res (Camb)*. 2018;7(6):1247–56.
64. Lee SJ, Bai SK, Lee KS, Namkoong S, Na HJ, Ha KS, et al. Astaxanthin inhibits nitric oxide production and inflammatory gene expression by suppressing I(kappa)B kinase-dependent NF-kappaB activation. *Mol Cells*. 2003 Aug 31;16(1):97–105.
65. Terazawa S, Nakajima H, Shingo M, Niwano T, Imokawa G. Astaxanthin attenuates the UVB-induced secretion of prostaglandin E2 and interleukin-8 in human keratinocytes by interrupting MSK1 phosphorylation in a ROS depletion-independent manner. *Exp Dermatol*. 2012 Jul;21:11–7.
66. Kohandel Z, Farkhondeh T, Aschner M, Pourbagher-Shahri AM, Samarghandian S. Anti-inflammatory action of astaxanthin and its use in the treatment of various diseases. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 2022 Jan;112179.
67. Sun Q, Wu J, Qian G, Cheng H. Effectiveness of Dietary Supplement for Skin Moisturizing in Healthy Adults: A Systematic Review and Meta-Analysis of Randomized Controlled Trials. *Front Nutr*. 2022 Jun 2;9.
68. Aneesh PA, Ajeeshkumar KK, Lekshmi RGK, Anandan R, Ravishankar CN, Mathew S. Bioactivities of astaxanthin from natural sources, augmenting its biomedical potential: A review. *Trends Food Sci Technol*. 2022 Jul;125:81–90.

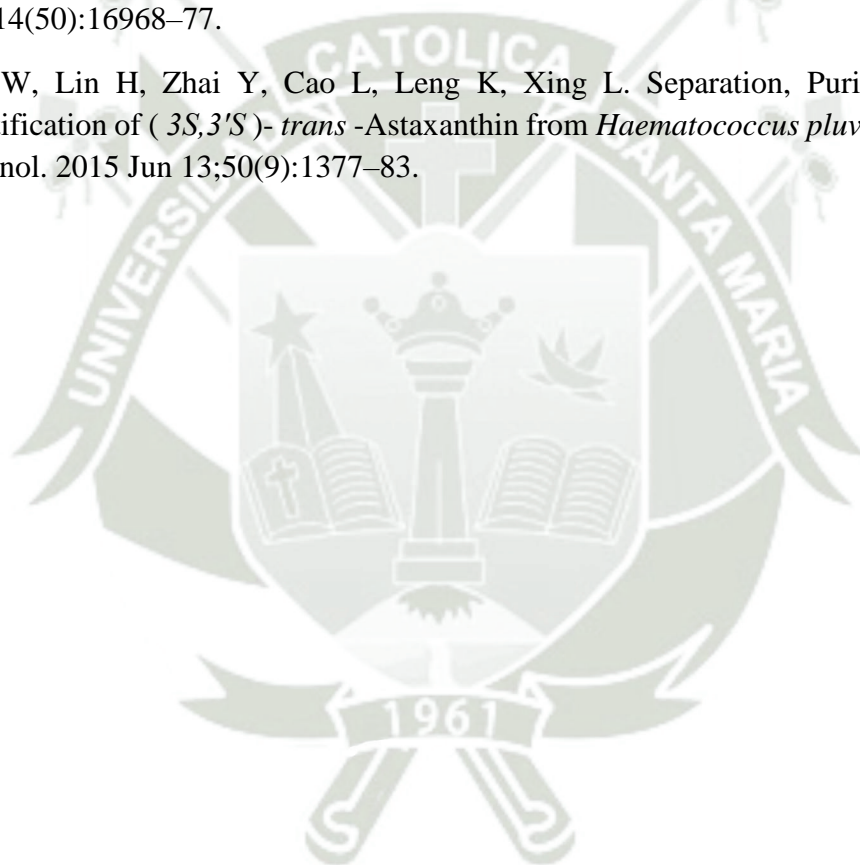
69. Capelli B, Bagchi D, Cysewski G. Synthetic astaxanthin is significantly inferior to algal-based astaxanthin as an antioxidant and may not be suitable as a human nutraceutical supplement. *Nutrafoods*. 2013 Dec 3;12(4):145–52.
70. Mota GCP, Moraes LBS de, Oliveira CYB, Oliveira DWS, Abreu JL de, Dantas DMM, et al. Astaxanthin from *Haematococcus pluvialis* : processes, applications, and market. *Prep Biochem Biotechnol*. 2022 May 2;52(5):598–609.
71. Chen G, Wang B, Han D, Sommerfeld M, Lu Y, Chen F, et al. Molecular mechanisms of the coordination between astaxanthin and fatty acid biosynthesis in *Haematococcus pluvialis* (Chlorophyceae). *The Plant Journal*. 2015 Jan;81(1):95–107.
72. Peng S, Long M, Zheng L, Song L, Li J. Physiological sensitivity of *Haematococcus pluvialis* (Chlorophyta) to environmental pollutants: a comparison with *Microcystis wesenbergii* (cyanobacteria) and *Pseudokirchneriella subcapitata* (Chlorophyta). *J Appl Phycol*. 2019 Feb 9;31(1):365–74.
73. Oslan SNH, Tan JS, Oslan SN, Matanjun P, Mokhtar RAM, Shapawi R, et al. *Haematococcus pluvialis* as a Potential Source of Astaxanthin with Diverse Applications in Industrial Sectors: Current Research and Future Directions. *Molecules*. 2021 Oct 27;26(21):6470.
74. Harker M, Tsavalos AJ, Young AJ. Factors responsible for astaxanthin formation in the Chlorophyte *Haematococcus pluvialis*. *Bioresour Technol*. 1996 Mar;55(3):207–14.
75. Han D, Li Y, Hu Q. Biology and Commercial Aspects of *Haematococcus pluvialis*. In: *Handbook of Microalgal Culture*. Oxford, UK: John Wiley & Sons, Ltd; 2013. p. 388–405.
76. Cordoba Astroc N, Acero Reyes N, Duque Buitrago L, Jimenez Aguilar J, Serna Jiménez JA. Obtención y caracterización de astaxantina de la microalga *Haematococcus pluvialis*. *UGCiencia*. 2016 Jan 27;21:73.
77. Chen G, Wang B, Han D, Sommerfeld M, Lu Y, Chen F, et al. Molecular mechanisms of the coordination between astaxanthin and fatty acid biosynthesis in *Haematococcus pluvialis* (Chlorophyceae). *The Plant Journal*. 2015 Jan;81(1):95–107.
78. Masojídek J, Torzillo G. Mass Cultivation of Freshwater Microalgae☆. In: *Reference Module in Earth Systems and Environmental Sciences*. Elsevier; 2014.
79. Marinho YF, Malafaia CB, de Araújo KS, da Silva TD, dos Santos APF, de Moraes LB, et al. Evaluation of the influence of different culture media on growth, life cycle, biochemical composition, and astaxanthin production in *Haematococcus pluvialis*. *Aquaculture International*. 2021 Apr 28;29(2):757–78.

80. Fábregas J, Otero A, Maseda A, Domínguez A. Two-stage cultures for the production of Astaxanthin from *Haematococcus pluvialis*. *J Biotechnol*. 2001 Jul;89(1):65–71.
81. Giannelli L, Yamada H, Katsuda T, Yamaji H. Effects of temperature on the astaxanthin productivity and light harvesting characteristics of the green alga *Haematococcus pluvialis*. *J Biosci Bioeng*. 2015 Mar;119(3):345–50.
82. Boussiba S. Carotenogenesis in the green alga *Haematococcus pluvialis*: Cellular physiology and stress response. *Physiol Plant*. 2000 Feb;108(2):111–7.
83. Roberty S, Bailleul B, Berne N, Franck F, Cardol P. Mehler reaction is the main alternative photosynthetic electron pathway in *Symbiodinium* sp., symbiotic dinoflagellates of cnidarians. *New Phytologist*. 2014 Oct 30;204(1):81–91.
84. Wang Y, Chen T. The biosynthetic pathway of carotenoids in the astaxanthin-producing green alga *Chlorella zofingiensis*. *World J Microbiol Biotechnol*. 2008 Dec 7;24(12):2927–32.
85. Han D, Li Y, Hu Q. Astaxanthin in microalgae: pathways, functions and biotechnological implications. *ALGAE*. 2013 Jun 15;28(2):131–47.
86. Oslan SNH, Shoparwe NF, Yusoff AH, Rahim AA, Chang CS, Tan JS, et al. A Review on *Haematococcus pluvialis* Bioprocess Optimization of Green and Red Stage Culture Conditions for the Production of Natural Astaxanthin. *Biomolecules*. 2021 Feb 10;11(2):256.
87. Wang L, Yang B, Yan B, Yao X. Supercritical fluid extraction of astaxanthin from *Haematococcus pluvialis* and its antioxidant potential in sunflower oil. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*. 2012 Jan;13:120–7.
88. Ruen-ngam D, Shotipruk A, Pavasant P. Comparison of Extraction Methods for Recovery of Astaxanthin from *Haematococcus pluvialis*. *Sep Sci Technol*. 2010 Dec 6;46(1):64–70.
89. Jin H, Lao YM, Zhou J, Zhang HJ, Cai ZH. Optimization of extraction solvents, solid phase extraction and decoupling for quantitation of free isoprenoid diphosphates in *Haematococcus pluvialis* by liquid chromatography with tandem mass spectrometry. *J Chromatog A*. 2019 Aug;1598:30–8.
90. Sun W, Lin H, Zhai Y, Cao L, Leng K, Xing L. Separation, Purification, and Identification of (3*S*,3'*S*)-*trans*-Astaxanthin from *Haematococcus pluvialis*. *Sep Sci Technol*. 2015 Jun 13;50(9):1377–83.
91. Du X, Dong C, Wang K, Jiang Z, Chen Y, Yang Y, et al. Separation and purification of astaxanthin from *Phaffia rhodozyma* by preparative high-speed counter-current chromatography. *Journal of Chromatography B*. 2016 Sep;1029–1030:191–7.

92. Lato M, Brunelli B, Ciuffini G, Mezzetti T. Bidimensional thin-layer chromatography of carbohydrates on silica gel impregnated with boric acid. *J Chromatog A*. 1968 Jan;34:26–34.
93. Li HB, Chen F. Preparative isolation and purification of astaxanthin from the microalga *Chlorococcum* sp. by high-speed counter-current chromatography. *J Chromatog A*. 2001 Aug;925(1–2):133–7.
94. Yuan C, Jin Z, Xu X. Inclusion complex of astaxanthin with hydroxypropyl- β -cyclodextrin: UV, FTIR, ^1H NMR and molecular modeling studies. *Carbohydr Polym*. 2012 Jun;89(2):492–6.
95. Holtin K, Kuehnle M, Rehbein J, Schuler P, Nicholson G, Albert K. Determination of astaxanthin and astaxanthin esters in the microalgae *Haematococcus pluvialis* by LC-(APCI)MS and characterization of predominant carotenoid isomers by NMR spectroscopy. *Anal Bioanal Chem*. 2009 Nov 23;395(6):1613–22.
96. Vanaja K, Shobha Rani RH. Design of Experiments: Concept and Applications of Plackett Burman Design. *Clin Res Regul Aff*. 2007 Jan 10;24(1):1–23.
97. TSUI KL. AN OVERVIEW OF TAGUCHI METHOD AND NEWLY DEVELOPED STATISTICAL METHODS FOR ROBUST DESIGN. *IIE Transactions*. 1992 Nov;24(5):44–57.
98. Khuri AI, Mukhopadhyay S. Response surface methodology. *WIREs Computational Statistics*. 2010 Mar 19;2(2):128–49.
99. Laezza C, Salbitani G, Carfagna S. Fungal Contamination in Microalgal Cultivation: Biological and Biotechnological Aspects of Fungi-Microalgae Interaction. *Journal of Fungi*. 2022 Oct 18;8(10):1099.
100. Hosikian A, Lim S, Halim R, Danquah MK. Chlorophyll Extraction from Microalgae: A Review on the Process Engineering Aspects. *International Journal of Chemical Engineering*. 2010;2010:1–11.
101. Allen MM, Stanier RY. Selective Isolation of Blue-green Algae from Water and Soil. *J Gen Microbiol*. 1968 Apr 1;51(2):203–9.
102. Kobayashi M, Kakizono T, Nagai S. Astaxanthin production by a green alga, *Haematococcus pluvialis* accompanied with morphological changes in acetate media. *J Ferment Bioeng*. 1991 Jan;71(5):335–9.
103. Oslan SNH, Shoparwe NF, Yusoff AH, Rahim AA, Chang CS, Tan JS, et al. A Review on *Haematococcus pluvialis* Bioprocess Optimization of Green and Red Stage Culture Conditions for the Production of Natural Astaxanthin. *Biomolecules*. 2021 Feb 10;11(2):256.

104. Wellburn AR. The Spectral Determination of Chlorophylls a and b, as well as Total Carotenoids, Using Various Solvents with Spectrophotometers of Different Resolution. *J Plant Physiol.* 1994 Sep;144(3):307–13.
105. Molino A, Rimauro J, Casella P, Cerbone A, Larocca V, Chianese S, et al. Extraction of astaxanthin from microalga *Haematococcus pluvialis* in red phase by using generally recognized as safe solvents and accelerated extraction. *J Biotechnol.* 2018 Oct;283:51–61.
106. Kang CD, Sim SJ. Direct extraction of astaxanthin from *Haematococcus* culture using vegetable oils. *Biotechnol Lett.* 2008 Mar 31;30(3):441–4.
107. Zhang ZM, Liu JF, Liu R, Sun JF, Wei GH. Thin Layer Chromatography Coupled with Surface-Enhanced Raman Scattering as a Facile Method for On-Site Quantitative Monitoring of Chemical Reactions. *Anal Chem.* 2014 Aug 5;86(15):7286–92.
108. Cheong JY. Isolation, optimization and recovery of astaxanthin from shrimp shell wastes of locally isolated *Aeromonas hydrophila* (Steiner). UNIVERSITI PUTRA MALAYSIA INSTITUTIONAL REPOSITORY. 2016 Aug;
109. Cramer M, Jayaraman G. Preparative chromatography in biotechnology. *Curr Opin Biotechnol* [Internet]. 1993 Apr [cited 2023 Oct 1];4(2):217–25. Available from: [https://doi.org/10.1016/0958-1669\(93\)90128-J](https://doi.org/10.1016/0958-1669(93)90128-J)
110. Jaime L, Mendiola JA, Herrero M, Soler-Rivas C, Santoyo S, Señorans FJ, et al. Separation and characterization of antioxidants from *Spirulina platensis* microalga combining pressurized liquid extraction, TLC, and HPLC-DAD. *J Sep Sci.* 2005 Oct 25;28(16):2111–9.
111. Neugebauer J, Veldstra J, Buda F. Theoretical Spectroscopy of Astaxanthin in Crustacyanin Proteins: Absorption, Circular Dichroism, and Nuclear Magnetic Resonance. *J Phys Chem B.* 2011 Mar 31;115(12):3216–25.
112. Gokare A, Ravishankar, Ambati Ranga Rao. *Global Perspectives on Astaxanthin.* Vol. 1. Elsevier; 2021.
113. Fábregas J, Domínguez A, Regueiro M, Maseda A, Otero A. Optimization of culture medium for the continuous cultivation of the microalga *H. pluvialis*. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2000 May 15;53(5):530–5.
114. Shao Y, Gu W, Jiang L, Zhu Y, Gong A. Study on the Visualization of Pigment in *Haematococcus pluvialis* by Raman Spectroscopy Technique. *Sci Rep.* 2019 Aug 20;9(1):12097.
115. Lemoine Y, Schoefs B. Secondary ketocarotenoid astaxanthin biosynthesis in algae: a multifunctional response to stress. *Photosynth Res.* 2010 Nov 13;106(1–2):155–77.

116. Zhang X, Li W, Dou X, Nan D, He G. Astaxanthin Encapsulated in Biodegradable Calcium Alginate Microspheres for the Treatment of Hepatocellular Carcinoma In Vitro. *Appl Biochem Biotechnol*. 2020 Jun 7;191(2):511–27.
117. Dong S, Huang Y, Zhang R, Wang S, Liu Y. Four Different Methods Comparison for Extraction of Astaxanthin from Green Alga *Haematococcus pluvialis*. *The Scientific World Journal*. 2014;2014:1–7.
118. Elguero J, Pardo C, Alkorta I. RESONANCIA MAGNÉTICA NUCLEAR DE PROTÓN: APLICACIONES EN QUÍMICA ORGÁNICA. 1st ed. Vol. 1. 2013.
119. Polyakov NE, Focsan AL, Bowman MK, Kispert LD. Free Radical Formation in Novel Carotenoid Metal Ion Complexes of Astaxanthin. *J Phys Chem B*. 2010 Dec 23;114(50):16968–77.
120. Sun W, Lin H, Zhai Y, Cao L, Leng K, Xing L. Separation, Purification, and Identification of (3*S*,3'*S*)-*trans*-Astaxanthin from *Haematococcus pluvialis*. *Sep Sci Technol*. 2015 Jun 13;50(9):1377–83.



ANEXOS

Anexo 1.

FORMULA	Concentración mg/L	MICROELEMENTOS	Concentración g/L
NaCl	25	ZnSO ₄ . 7H ₂ O	8,82
MgSO ₄ . 7H ₂ O	75	MnCl ₂ . 4H ₂ O	1,44
CaCl ₂ . 2H ₂ O	25	CuSO ₄ . 5H ₂ O	1,57
NaNO ₃	250	Co(NO ₃) ₂ . 6H ₂ O	0,49
K ₂ HPO ₄	75	Na ₂ MoO ₄ . 2H ₂ O*	0,39
KH ₂ PO ₄	175	<i>SOLUCIÓN 1</i> Concentración g/L	
H ₃ BO ₃	11.42	Na ₂ . EDTA	50
<i>Micronutrientes</i>	1 mL	KOH	3,1
<i>Solución 1</i>	1 mL	<i>SOLUCIÓN 2</i> Concentración g/L	
<i>Solución 2</i>	1 mL	FeSO ₄	4,98
<i>pH final</i>	6,8	H ₂ SO ₄ . (95-98%)	1

Tabla 8. *Bold's Basal Medium (BBM) formula modificada.*

Anexo 2.

<i>Temperatura</i>	17 °C	<i>Nitrógeno</i>	25g per 1L
	34 °C		-
<i>UV</i>	-	<i>Fosforo</i>	25g per 1L
	15min a 40cm		-
<i>Intensidad</i>	30 Watts	<i>Acetato</i>	2g per 1L
	120 Watts		-
<i>Tiempo</i>	12 h	<i>NaCl</i>	5g per 1L
	24 h		-

Tabla 9. *Variables físicas y químicas para inducción de astaxantina.*

Anexo 3.

<i>COMPUESTOS</i>	<i>200mL</i>	<i>NaCl</i>	<i>ACETATO</i>	<i>NITRÓGENO</i>	<i>FOSFORO</i>
<i>KH₂PO₄</i>	3,5	3,5	3,5	3,5	-
<i>CaCl₂ . 2H₂O</i>	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
<i>MgSO₄ . 7H₂O</i>	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5
<i>NaNO₃</i>	5	5	5	-	5
<i>K₂HPO₄</i>	1,5	1,5	1,5	1,5	-
<i>NaCl</i>	1	-	1	1	1
<i>H₃BO₃</i>	0,228	0,228	0,228	0,228	0,228
<i>Acetato</i>	0,4	-	0,4	-	-
<i>Microelementos</i>	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
<i>Solución 1</i>	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
<i>Solución 2</i>	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2

Tabla 10. Componentes de medio BBM para 200mL de cada experimento.

<i>ORDEN</i>	<i>NACL</i>	<i>ACETATO</i>	<i>NITROGENO</i>	<i>FOSFORO</i>	<i>TIEMPO</i>	<i>INTENSIDAD</i>	<i>UV</i>	<i>TEMPERATURA</i>
1	1	1	1	-1	1	-1	1	-1
2	-1	1	1	1	1	1	-1	1
3	1	-1	1	-1	-1	1	1	1
4	1	-1	-1	-1	1	1	-1	1
5	1	1	-1	1	-1	1	-1	-1
6	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1
7	-1	-1	-1	1	1	-1	1	1
8	-1	1	-1	-1	1	1	1	-1
9	1	1	-1	1	-1	-1	1	1
10	-1	1	1	-1	-1	-1	-1	1
11	1	-1	1	1	1	-1	-1	-1
12	-1	-1	1	1	-1	1	1	-1

Tabla 11. Variables para usar en medio Basal bold por orden de corrida.

Anexo 4.

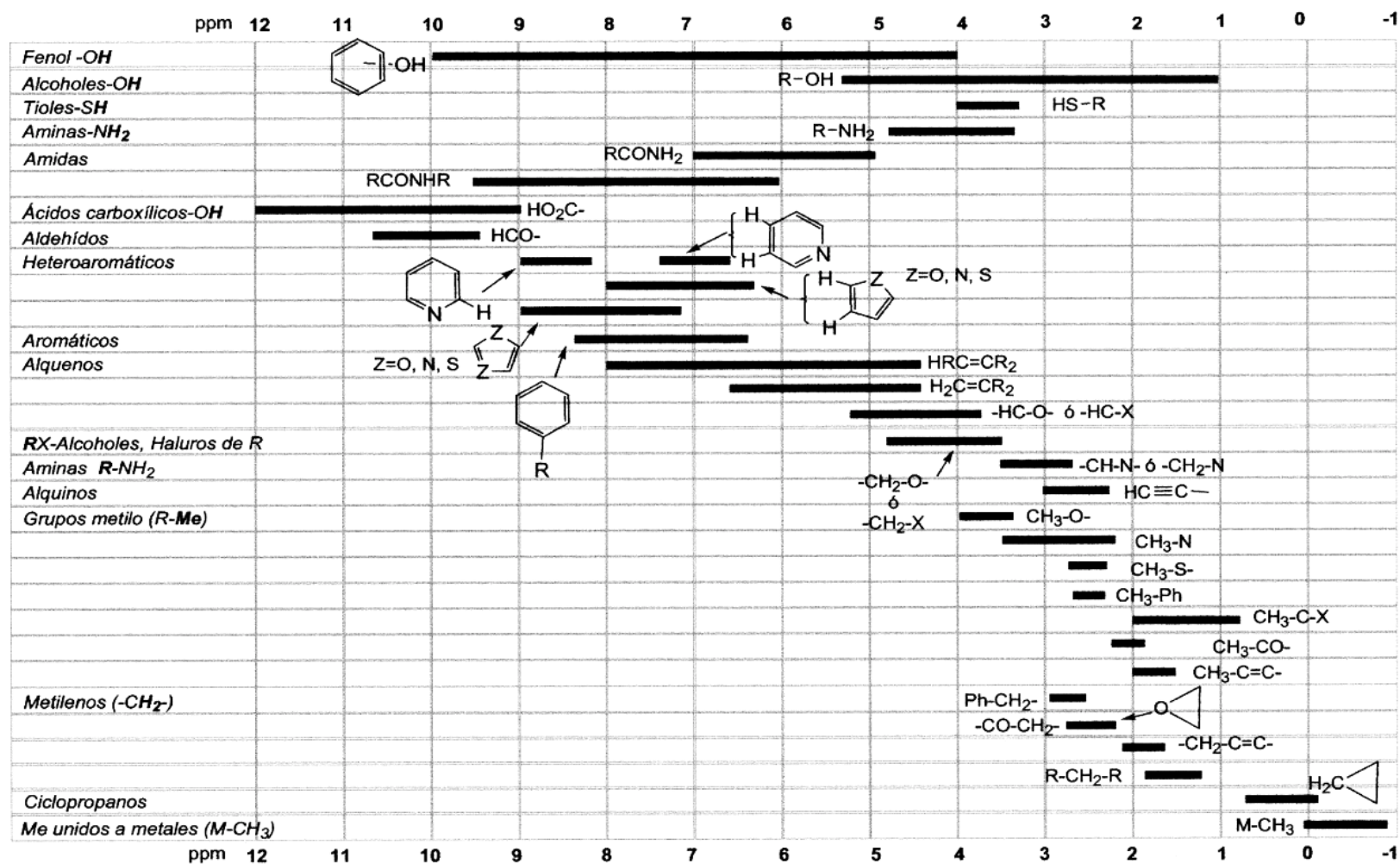


Tabla 12. Desplazamientos Químicos en RMN ^1H en diferentes tipos de compuestos orgánicos.

Sustituyente	Metilo	Etilo		n-Propilo			Isopropilo		c-Butilo	
	-CH ₃	-CH ₂	-CH ₃	-CH ₂	-CH ₂	-CH ₃	-CH	-CH ₃	-CH ₃	
C	-H	0.23	0.86	0.86	0.91	1.33	0.91	1.33	0.91	0.89
	-CH=CH ₂	1.71	2.00	1.00						1.02
H	-C≡CH ₂	1.80	2.16	1.15	2.10	1.50	0.97	2.59	1.15	1.22
	-fenilo	2.35	2.63	1.21	2.59	1.65	0.95	2.89	1.25	1.32
A	-F l)	4.27	4.36	1.24						1.34
	-Cl	3.06	3.47	1.33	3.47	1.81	1.06	4.14	1.55	1.60
L	-Br	2.69	3.37	1.66	3.35	1.89	1.06	4.21	1.73	1.76
	-I	2.16	3.16	1.88	3.16	1.88	1.03	4.24	1.89	1.95
O	-OH	3.39	3.59	1.18	3.49	1.53	0.93	3.94	1.16	1.22
	-O-alquilo	3.24	3.37	1.15	3.27	1.55	0.93	3.55	1.08	1.24
N	-OCH=CH ₂	3.5	3.66	1.21						
	-O-fenilo	3.73	3.98	1.38	3.86	1.70	1.05	4.51	1.31	
S	-OCOCH ₃	3.67	4.05	1.21	3.98	1.56	0.97	4.94	1.22	1.45
	-OCO-fenilo	3.88	4.37	1.38	4.25	1.76	1.07	5.22	1.37	1.58
N	-OSO ₂ -p-tolilo	3.70	4.07	1.30	3.94	1.60	0.95	4.70	1.25	
	-NH ₂	2.47	2.74	1.10	2.61	1.43	0.93	3.07	1.03	1.15
S	-NHCOCH ₃	2.71	3.21	1.12	3.18	1.55	0.96	4.01	1.13	1.28
	-NO ₂	4.29	4.37	1.58	4.28	2.01	1.03	4.44	1.53	1.59
S	-SH	2.00	2.44	1.31	2.46	1.57	1.02	3.16	1.34	1.43
	-S-alquilo	2.09	2.49	1.25	2.43	1.59	0.98	2.93	1.25	1.39
O	-S-S-alquilo	2.30	2.67	1.35	2.63	1.71	1.03			1.32
	-CHO	2.20	2.46	1.13	2.42	1.67	0.97	2.39	1.13	1.07
C	-COCH ₃	2.09	2.47	1.05	2.32	1.56	0.93	2.54	1.08	1.12
	-CO-fenilo	2.55	2.92	1.18	2.86	1.72	1.02	3.58	1.22	
O	-COOH	2.08	2.36	1.16	2.31	1.68	1.00	2.56	1.21	1.23
	-COOCH ₃	2.01	2.28	1.12	2.22	1.65	0.98	2.48	1.15	1.16
C	-CONH ₂	2.02	2.23	1.13	2.19	1.68	0.99	2.44	1.18	1.22
	-C(CH ₃)=NOH	1.9	2.22; 2.40	1.09	2.25	1.56	0.91			1.15
C	-CN	1.98	2.35	1.31	2.29	1.71	1.11	2.67	1.35	1.37

Tabla 13. Desplazamientos químicos de alcanos mono-sustituídos.



H-C≡C-H	1.80	$\overset{a}{\text{CH}_3}-\overset{b}{\text{C}}\equiv\text{C}-\text{H}$	(a) 1.80
H-C≡C-alquilo	1.7-1.9		(b) 1.80
H-C≡C-C=C	2.6-3.1	$\overset{b}{\text{CH}_3}\overset{a}{\text{CH}_2}-\text{C}\equiv\text{CH}$	(a) 2.16
H-C≡C-C≡C	1.7-2.4		(b) 1.15
H-C≡C- 	2.7-3.4	$(\text{CH}_3)_2\overset{a}{\text{CH}}-\overset{b}{\text{C}}\equiv\text{CH}$	(a) 2.59
			(b) 1.15
H-C≡C-O-alquilo	1.3	 - $\overset{a}{\text{SO}_3}\overset{b}{\text{CH}_2}-\text{C}\equiv\text{CH}$	(a) ~4.7
H-C≡C-CO	2.1-3.3		(b) 2.55
		$\text{CH}_3\overset{a}{\text{CONH}}\overset{b}{\text{CH}_2}-\text{C}\equiv\text{CH}$	(a) 4.06
CH ₃ -C≡C-H	J = 2.9		(b) 2.25
CH ₃ -C≡C-CH ₃	J = 2.7		
H-C≡C-C≡C-H	J = 2.2		

Tabla 14. Desplazamientos químicos de ¹H y constantes de acoplamiento de derivados acetílicos.

Alcanos

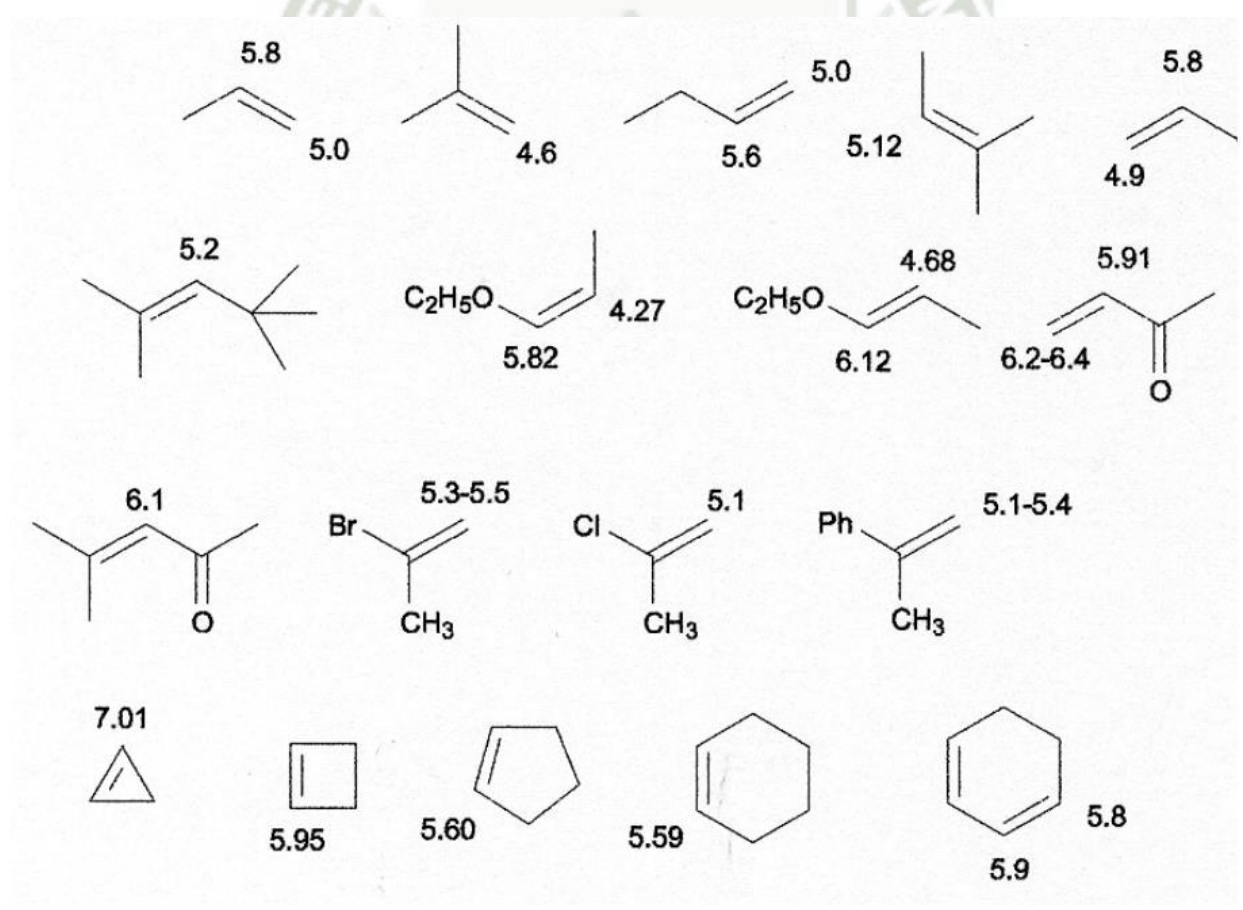
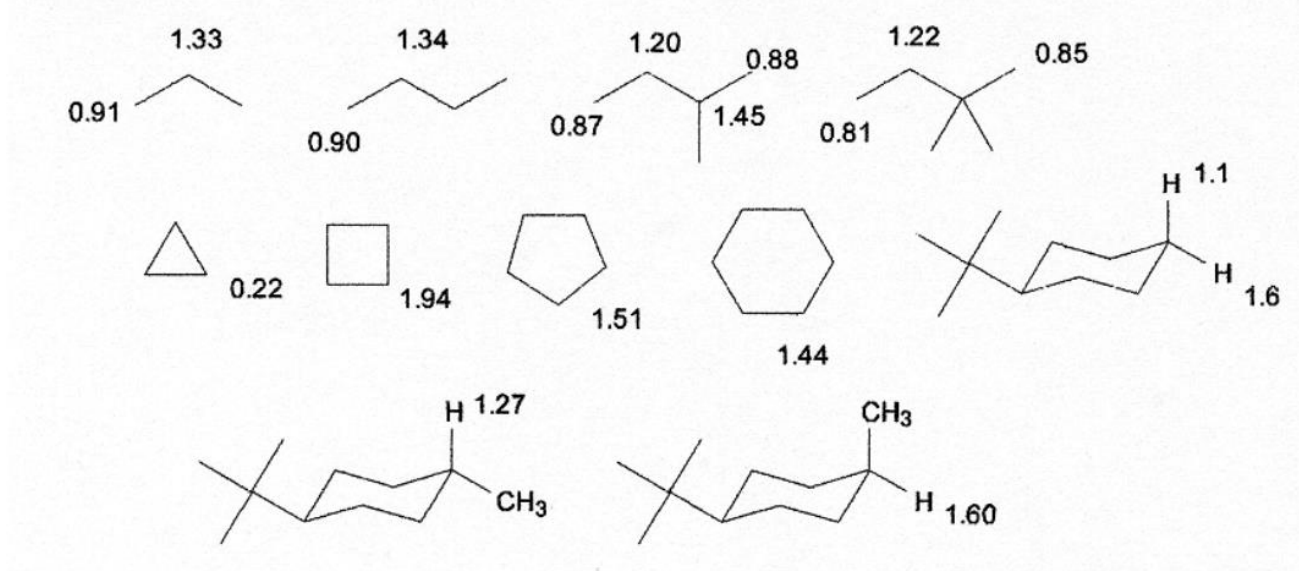


Tabla 15. Desplazamientos de protones unidos a carbonos sp^2 .

Sustituyente R		Z_{gem}	Z_{cis}	Z_{trans}	
C	-H	0	0	0	
	-alquilo	0.45	-0.22	-0.28	
	-alquilo-anillo ¹⁾	0.69	-0.25	-0.28	
	-CH ₂ -aromático	1.05	-0.29	-0.32	
	-CH ₂ X, X: F, Cl, Br	0.70	0.11	-0.04	
	-CHF ₂	0.66	0.32	0.21	
	-CF ₃	0.66	0.61	0.32	
	-CH ₂ O	0.64	-0.01	-0.02	
	-CH ₂ N	0.58	-0.10	-0.08	
	-CH ₂ S	0.71	-0.13	-0.22	
	-CH ₂ CO, CH ₂ CN	0.69	-0.08	-0.06	
	-C=C aislado	1.00	-0.09	-0.23	
	-C=C conjugado ²⁾	1.24	0.02	-0.05	
	-C=C	0.47	0.38	0.12	
	-aromático con giro libre	1.38	0.36	-0.07	
	-aromático fijo ³⁾	1.60	-	-0.05	
	-aromático sustituido en o	1.65	0.19	0.09	
	HAL	-F	1.54	-0.40	-1.02
		-Cl	1.08	0.18	0.13
-Br		1.07	0.45	0.55	
-I		1.14	0.81	0.88	
O	-OR, R alifático	1.22	-1.07	-1.21	
	-OR, R insaturado	1.21	-0.60	-1.00	
	-OCOR	2.11	-0.35	-0.64	
	-NH ₂	0.80	-1.26	-1.21	
	-NHR, R alifático	0.80	-1.26	-1.21	
	-NR ₂ , R alifático	0.80	-1.26	-1.21	
	-NHR, R insaturado	1.17	-0.53	-0.99	
	-NRR', R insaturado R' cualquier sust. }	1.17	-0.53	-0.99	
	-NCOR	2.08	-0.57	-0.72	
	-N=N-fenilo	2.39	1.11	0.67	
S	-NO ₂	1.87	1.30	0.62	
	-SR	1.11	-0.29	-0.13	
	-SOR	1.27	0.67	0.41	
	-SO ₂ R	1.55	1.16	0.93	
	-SCOR	1.41	0.06	0.02	
	-SCN	0.80	1.17	1.11	
	-SF ₅	1.68	0.61	0.49	
	-CHO	1.02	0.95	1.17	
	-CO aislado	1.10	1.12	0.87	
	-CO conjugado ¹⁾	1.06	0.91	0.74	
O=C\	-COOH aislado	0.97	1.41	0.71	
	-COOH conjugado ¹⁾	0.80	0.98	0.32	
	-COOR aislado	0.80	1.18	0.55	
	-COOR conjugado ¹⁾	0.78	1.01	0.46	
	-CONR ₂	1.37	0.98	0.46	
	-COCl	1.11	1.46	1.01	
	-CN	0.27	0.75	0.55	
	-PO (OCH ₂ CH ₃) ₂	0.66	0.88	0.67	
	-OPO (OCH ₂ CH ₃) ₂	1.33	-0.34	-0.66	

Tabla 16. Estimación del desplazamiento de protones unidos a doble enlace.

Tabla II puede ser usada para calcular los desplazamientos químicos de Y-CH₃, Y-CH₂-Z, o Y-CH-Z.

De allí que, el desplazamiento químico en BrCH₂²CH₂¹OCH₂CH₂Br puede ser calculado.

1-CH ₂		2-CH ₂	
CH ₂ standard (pie de página b)	1.20	CH ₂ standard	1.20
α -OR	2.35	α -Br	2.18
β -Br	0.60	β -OR	0.15
	<hr/> 4.15		<hr/> 3.53

Tabla II. Efectos de los sustituyentes en los desplazamientos químicos^a

Sustituyente	C-C-H		Desplazamiento alfa	Desplazamiento Beta
	β	α		
-C=C-	CH ₃		0.78	-
	CH ₂		0.75	0.10
	CH		-	-
-C=C-C-R X (X=C or O)	CH ₃		1.08	-
Aryl	CH ₃		1.40	0.35
	CH ₂		1.45	0.53
	CH		1.33	-
-Cl	CH ₃		2.43	0.63
	CH ₂		2.30	0.53
	CH		2.55	0.03
-Br	CH ₃		1.80	0.83
	CH ₂		2.18	0.60
	CH		2.68	0.25
-I	CH ₃		1.28	1.23
	CH ₂		1.95	0.58
	CH		2.75	0.00
-OH	CH ₃		2.50	0.33
	CH ₂		2.30	0.13
	CH		2.20	-
-OR (R is saturated)	CH ₃		2.43	0.33
	CH ₂		2.35	0.15
	CH		2.00	-
-OC-R, -OC-OR, -OAr O	CH ₃		2.88	0.38
	CH ₂		2.98	0.43
	CH		3.43 (esters only)	-
-CR, where R is alkyl, aryl, OH, OR', H, CO, or N	CH ₃		1.23	0.18
	CH ₂		1.05	0.31
	CH		1.05	-
-NRR'	CH ₃		1.30	0.13
	CH ₂		1.33	0.13
	CH		1.33	-

^a Tomado de la tesis Doctoral de T.P. Curphey, Universidad de Harvard.

^b Las posiciones standard son: CH₃, 80.87; CH₂, 81.20; CH, 81.55

Tabla 17. Estimación del desplazamiento de grupos -CH₃, -CH₂ y CH.

Anexo 5.

Barrido_03_11_2022_15:02:14

1 / 2

03-nov.-2022 03:31 p. m.

N.º serie del instrumento: 9A5X354048

Nombre del método: Barrido 03-nov.-2022

Modelo instrumento: GENESYS 150

Método creado: 03-nov.-2022 02:59 p. m.

Versión de paquete de software: 2.3

Firma:

Método actualizado: 03-nov.-2022 02:59 p. m.

Barrido:parámetros de método

Intervalo de longitudes de onda **325 - 750 nm**

Intervalo **2,0 nm**

Velocidad **Rápida**

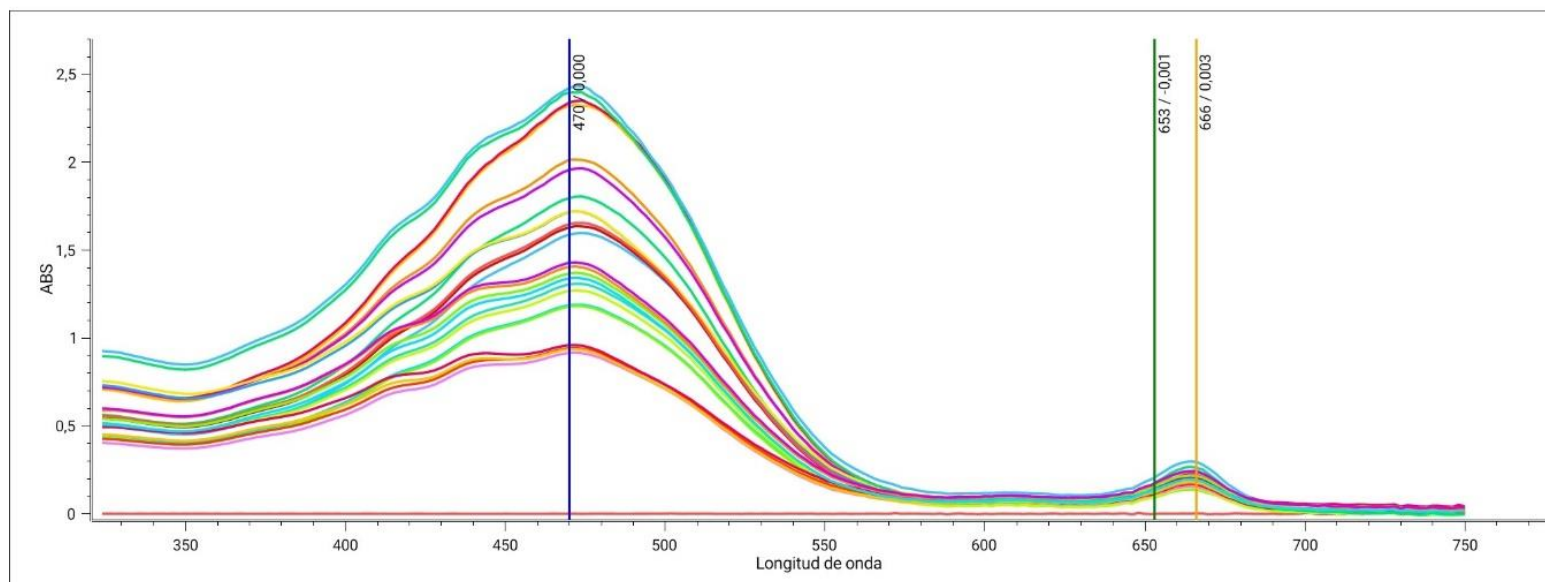


Figura 46. Barrido espectral para evaluación de carotenoides.

Anexo 6.

	Rep 1	Rep 2	Rep 3	Rep 4	Average	SD	CV	NaCl	Acetato	N	P	Time	Inten	UV	Temp	+NaCl	+Acetato	- N	- P	Time	Inten	UV	Temp	
1	5,994	5,995	6,065	5,990	6,011	0,036	0,006	1	1	1	-1	1	-1	1	-1	6,065	6,065	6,065	-6,065	6,065	-6,065	6,065	-6,065	
2	5,921	5,981	5,897	5,826	5,906	0,064	0,011	-1	1	1	1	1	1	-1	1	-5,897	5,897	5,897	5,897	5,897	5,897	-5,897	5,897	
3	4,777	4,779	4,764	4,734	4,763	0,021	0,004	1	-1	1	-1	-1	1	1	1	4,764	-4,764	4,764	-4,764	-4,764	4,764	4,764	4,764	
4	8,952	8,975	9,009	8,987	8,981	0,024	0,003	1	-1	-1	-1	1	1	-1	1	9,009	-9,009	-9,009	-9,009	9,009	9,009	-9,009	9,009	
5	6,601	6,521	6,664	6,682	6,617	0,073	0,011	1	1	-1	1	-1	1	-1	-1	6,664	6,664	-6,664	6,664	-6,664	6,664	-6,664	-6,664	
6	2,801	2,793	2,801	2,797	2,798	0,004	0,001	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-2,801	-2,801	-2,801	-2,801	-2,801	-2,801	-2,801	-2,801	
7	7,381	7,352	7,363	7,373	7,367	0,013	0,002	-1	-1	-1	1	1	-1	1	1	-7,363	-7,363	-7,363	7,363	7,363	-7,363	7,363	7,363	
8	4,762	4,629	4,619	4,628	4,659	0,068	0,015	-1	1	-1	-1	1	1	1	-1	-4,619	4,619	-4,619	-4,619	4,619	4,619	4,619	-4,619	
9	8,712	8,701	8,776	8,742	8,733	0,034	0,004	1	1	-1	1	-1	-1	1	1	8,776	8,776	-8,776	8,776	-8,776	-8,776	8,776	8,776	
10	2,982	2,947	2,946	2,966	2,960	0,017	0,006	-1	1	1	-1	-1	-1	-1	1	-2,946	2,946	2,946	-2,946	-2,946	-2,946	-2,946	2,946	
11	4,171	4,168	4,167	4,174	4,170	0,003	0,001	1	-1	1	1	1	-1	-1	-1	4,167	-4,167	4,167	4,167	4,167	-4,167	-4,167	-4,167	
12	4,539	4,644	4,551	4,538	4,568	0,051	0,011	-1	-1	1	1	-1	1	1	-1	-4,551	-4,551	4,551	4,551	-4,551	4,551	4,551	-4,551	
																Efecto	1,878	0,385	-1,807	1,203	1,103	0,564	0,775	1,648
																SS	42,339	1,781	39,189	17,354	14,597	3,821	7,217	32,578
																Rank	27	1	25	11	9	2	5	21
																Rank	1	8	2	4	5	7	6	3

Tabla 18. Evaluación de diferentes variables mediante cuantificación de carotenoides.

Anexo 7.

<i>NaCl</i>		<i>N</i>		<i>P</i>	
-1	3	-1	0	-1	5
0	5	0	10	0	15
1	7	1	20	1	25
g per 1L		g per 1L 25 g /L		g per 1L 17,5 +7.5	

	<i>Rep 1</i>	<i>Rep 2</i>	<i>Average/Promedio</i>	<i>SD</i>	<i>CV</i>
1	2,344	2,448	2,396	0,073	0,031
2	3,367	3,371	3,369	0,003	0,001
3	2,168	2,177	2,172	0,007	0,003
4	3,373	3,379	3,376	0,004	0,001
5	3,846	3,819	3,832	0,019	0,005
6	2,974	2,947	2,961	0,020	0,007
7	2,778	2,746	2,762	0,023	0,008
8	3,543	3,611	3,577	0,048	0,014
9	1,596	1,563	1,579	0,023	0,014
10	3,369	3,376	3,373	0,005	0,001
11	4,811	4,846	4,829	0,025	0,005
12	3,466	3,477	3,471	0,007	0,002
13	2,812	2,803	2,808	0,006	0,002
14	1,817	1,805	1,811	0,008	0,005
15	3,689	3,730	3,710	0,029	0,008

Tabla 19. Evaluación de inducción de variables químicas por RSM.

Anexo 8.

ABS 1	653	666	470	C A	C B	CT
1	0,187	0,240	0,960	2,383	2,368	2,642
2	0,195	0,300	0,900	3,264	1,912	2,627
3	0,177	0,250	0,914	2,613	1,985	2,653
1	0,249	0,249	1,310	2,069	3,944	3,243
2	0,230	0,128	1,415	0,315	4,787	3,248
3	0,238	0,190	1,350	1,227	4,308	3,224
1	0,200	0,266	1,000	2,695	2,428	2,770
2	0,198	0,274	0,989	2,835	2,284	2,799
3	0,203	0,287	1,006	3,002	2,274	2,872
	Rep 1	Rep 2	Rep 3	Average	SD	CV
4	2,642	2,627	2,653	2,641	0,013	0,005
5	3,243	3,248	3,224	3,238	0,012	0,004
6	2,770	2,799	2,872	2,814	0,053	0,019

ABS 1	653	666	470	C A	C B	CT
1	0,199	0,100	0,870	0,104	4,262	1,302
2	0,190	0,098	0,851	0,139	4,041	1,341
3	0,188	0,100	0,835	0,185	3,964	1,315
1	0,200	0,112	0,968	0,285	4,154	1,757
2	0,188	0,100	0,946	0,185	3,964	1,768
3	0,190	0,090	0,963	0,014	4,131	1,752
1	0,180	0,209	1,240	1,950	2,526	3,706
2	0,200	0,196	1,311	1,599	3,213	3,638
3	0,190	0,200	1,302	1,735	2,898	3,766
	Rep 1	Rep 2	Rep 3	Average	SD	CV
0	1,302	1,341	1,315	1,320	0,020	0,015
2.5	1,757	1,768	1,752	1,759	0,008	0,005
5	3,706	3,638	3,766	3,703	0,064	0,017

Tabla 20. Evaluación de corroboración de variables químicas.

Anexo 9.

<i>Temperatura</i>		<i>Tiempo</i>	
1	30	1	12
2	37	2	18
3	45	3	24

34 °C

24 h

	<i>Rep 1</i>	<i>Rep 2</i>	<i>Rep 3</i>	<i>Rep 4</i>	<i>Average/Promedio</i>	<i>SD</i>	<i>CV</i>
1	1,446	1,474	1,443	1,458	1,455	0,014	0,010
2	2,788	2,784	2,759	2,793	2,781	0,015	0,005
3	1,860	1,826	1,844	1,855	1,847	0,015	0,008
4	1,406	1,417	1,415	1,420	1,415	0,006	0,004
5	3,916	3,988	3,904	3,980	3,947	0,043	0,011
6	2,703	2,660	2,714	2,712	2,697	0,026	0,009
7	1,470	1,489	1,482	1,472	1,478	0,009	0,006
8	1,488	1,442	1,481	1,496	1,477	0,024	0,016
9	1,459	1,455	1,451	1,446	1,453	0,006	0,004

Tabla 21. *Evaluación de inductores físicos con método Taguchi.*

Anexo 10.

ABS 1	653	666	470	C A	C B	CT
1	0,229	0,129	1,290	0,338	4,748	2,757
2	0,230	0,123	1,299	0,237	4,843	2,746
3	0,200	0,112	1,240	0,285	4,154	2,867
1	0,162	0,100	1,500	0,376	3,261	4,398
2	0,159	0,107	1,449	0,507	3,101	4,273
3	0,164	0,099	1,501	0,346	3,326	4,368

	Rep 1	Rep 2	Rep 3	Average/Promedio	SD	CV
12	2,757	2,746	2,867	2,790	0,067	0,024
18	4,398	4,273	4,368	4,346	0,066	0,015

Tabla 22. Evaluación de corroboración de variables de tiempo.

Anexo II.

<i>Temperatura</i>		<i>Tiempo</i>		<i>Concentración</i>	
-1	20	-1	10	-1	48
0	35	0	35	0	72
1	50	1	60	1	96

	<i>Rep 1</i>	<i>Rep 2</i>	<i>Average/Promedio</i>	<i>Regression Equation in Uncoded Units</i>	<i>SD</i>	<i>CV</i>
<i>1</i>	14,327	14,092	14,209	17,736	0,166	0,012
<i>2</i>	12,959	12,564	12,761	15,875	0,279	0,022
<i>3</i>	17,893	17,323	17,608	17,899	0,403	0,023
<i>4</i>	18,707	18,214	18,461	20,826	0,349	0,019
<i>5</i>	14,396	14,787	14,592	15,523	0,277	0,019
<i>6</i>	13,691	13,818	13,754	12,845	0,090	0,007
<i>7</i>	14,031	13,992	14,012	17,864	0,028	0,002
<i>8</i>	12,881	12,966	12,924	15,463	0,060	0,005
<i>9</i>	17,904	17,361	17,632	17,899	0,385	0,022
<i>10</i>	15,501	15,273	15,387	16,119	0,161	0,010
<i>11</i>	12,963	13,001	12,982	12,625	0,027	0,002
<i>12</i>	12,606	12,488	12,547	15,697	0,083	0,007
<i>13</i>	18,755	18,226	18,491	20,946	0,374	0,020
<i>14</i>	12,888	12,735	12,811	15,293	0,108	0,008
<i>15</i>	17,899	17,345	17,622	17,899	0,392	0,022

Tabla 23. *Evaluación de factores que afectan la extracción de astaxantina.*

¹H NMR Coupling Constant Prediction

shift	atom index	coupling partner,	constant	and vector
5.48	8			
5.48	41			
4.36	2			
		1	7.0	H-C-CH-H
4.36	35			
		34	7.0	H-C-CH-H
1.47	1 diastereotopic		-12.4	H-C-H
		2	7.0	H-CH-C-H
1.47	34 diastereotopic		-12.4	H-C-H
		35	7.0	H-CH-C-H
2.34	9			
2.34	40			
1.24	10			
1.24	11			
1.24	42			
1.24	43			
2.12	31			
		49	-1.0	H-CH ₂ >C=C>H
2.12	38			
		50	-1.0	H-CH ₂ >C=C>H
2.12	32			
		52	-1.0	H-CH ₂ >C=C>H
2.12	39			
		51	-1.0	H-CH ₂ >C=C>H
6.51	45			
		47	15.1	H>C=C>H
6.51	46			
		48	15.1	H>C=C>H
6.51	47			
		45	15.1	H>C=C>H
6.51	48			
		46	15.1	H>C=C>H
6.23	49			
		31	-1.0	H>C=C>CH ₂ -H
6.23	50			
		38	-1.0	H>C=C>CH ₂ -H
6.23	51			
		39	-1.0	H>C=C>CH ₂ -H
6.23	52			
		32	-1.0	H>C=C>CH ₂ -H
6.51	53			
		55	15.1	H>C=C>H
6.51	54			
		56	15.1	H>C=C>H
6.51	55			
		53	15.1	H>C=C>H
6.51	56			
		54	15.1	H>C=C>H
6.51	57			
		58	15.1	H>C=C>H
6.51	58			
		57	15.1	H>C=C>H

Tabla 24. Tabla de estimación de desplazamiento y acoplamiento químico de astaxantina.

CH3	1.24	0.86	methyl
		0.25	1 beta -C=C-C=O
		0.05	1 beta -CC
		0.05	1 beta -C
		0.03	general corrections
CH3	1.24	0.86	methyl
		0.25	1 beta -C=C-C=O
		0.05	1 beta -CC
		0.05	1 beta -C
		0.03	general corrections
CH3	2.12	0.86	methyl
		0.85	1 alpha -C=C
		0.41	general corrections
CH3	2.12	0.86	methyl
		0.85	1 alpha -C=C
		0.41	general corrections
CH3	2.12	0.86	methyl
		0.85	1 alpha -C=C
		0.41	general corrections
CH3	2.12	0.86	methyl
		0.85	1 alpha -C=C
		0.41	general corrections
H	6.51	5.25	1-ethylene
		1.24	1 -C=C gem
H	6.23	5.25	1-ethylene
		0.02	1 -C=C cis
		-0.28	1 -C trans
		1.24	1 -C=C gem
H	6.23	5.25	1-ethylene
		0.02	1 -C=C cis
		-0.28	1 -C trans
		1.24	1 -C=C gem
H	6.23	5.25	1-ethylene
		0.02	1 -C=C cis
		-0.28	1 -C trans
		1.24	1 -C=C gem
H	6.23	5.25	1-ethylene
		0.02	1 -C=C cis
		-0.28	1 -C trans
		1.24	1 -C=C gem
H	6.51	5.25	1-ethylene
		1.24	1 -C=C gem
		0.02	1 -C=C cis
H	6.51	5.25	1-ethylene
		1.24	1 -C=C gem
		0.02	1 -C=C cis
H	6.51	5.25	1-ethylene
		0.02	1 -C=C cis
		1.24	1 -C=C gem
H	6.51	5.25	1-ethylene
		0.02	1 -C=C cis
		1.24	1 -C=C gem
H	6.51	5.25	1-ethylene

Tabla 24. *Tabla de estimación de desplazamiento y acoplamiento químico de astaxantina.*

Anexo 13.

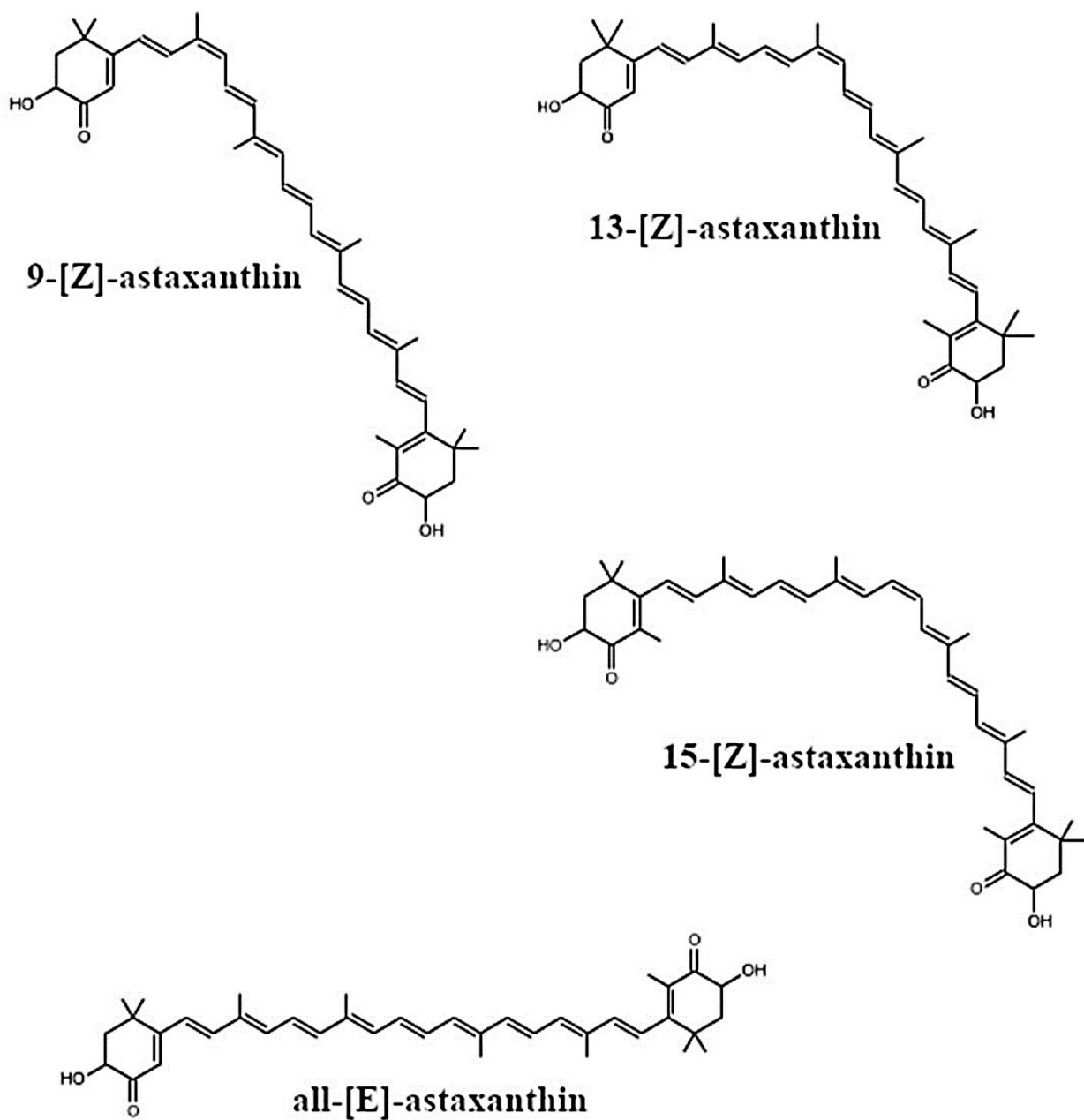


Figura 48. Diferentes isómeros de astaxantina.



Tesis financiada y realizada a través del Vicerrectorado de Investigación de la Universidad Católica de Santa María mediante el concurso fondo para la:

Investigación – Tipo 2, Resolución N°25262-R-2021.